



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 283 759**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C12N 15/20 (2006.01)
C12N 5/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03712270 .2**

86 Fecha de presentación : **20.01.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1461359**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **29.09.2004**

54 Título: **Anticuerpos anti-IGF-IR y sus aplicaciones.**

30 Prioridad: **18.01.2002 FR 02 00653**
18.01.2002 FR 02 00654
07.05.2002 FR 02 05753

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2007

73 Titular/es: **PIERRE FABRE MEDICAMENT**
45, place Abel Gance
92100 Boulogne, FR

72 Inventor/es: **Goetsch, Liliane;**
Corvaia, Nathalie y
Leger, Olivier

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-IGF-IR y sus aplicaciones.

La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos capaces de unirse específicamente al receptor humano del factor de crecimiento I de tipo insulina IGF-IR, y/o capaces de inhibir específicamente la actividad de tirosina quinasa de dicho receptor de IGF-IR, especialmente anticuerpos monoclonales murinos, quiméricos y humanizados, así como a las secuencias de aminoácidos y nucleicas que codifican estos anticuerpos. La invención comprende igualmente el uso de estos anticuerpos como un medicamento para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de cánceres que sobreexpresan el IGF-IR, o cualquier patología relacionada con la sobreexpresión de dicho receptor, así como a procedimientos o equipos para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con la sobreexpresión del receptor IGF-IR.

El receptor del factor de crecimiento I de tipo insulina, denominado IGF-IR, es un receptor con actividad de tirosina quinasa que tiene 70% de homología con el receptor de insulina IR. El IGF-IR es una glucoproteína de peso molecular de aproximadamente 350.000. Es un receptor heterotetramérico del cual cada mitad - enlazada por puentes de disulfuro - comprende una subunidad α extracelular y una subunidad β transmembránica (véase la figura 1). El IGF-IR se une al IGF I e IGF II con una afinidad muy alta ($K_d \# 1$ nM), pero es igualmente capaz de unirse a la insulina con una afinidad 100 a 1000 veces menor. A la inversa, el IR se une a la insulina con una afinidad muy alta, aunque los IGF se unen sólo al receptor de insulina con una afinidad 100 veces menor. El dominio de tirosina quinasa del IGF-IR y del IR tiene una homología de secuencia muy alta, mientras que las zonas de homología más débil se refieren respectivamente a la región rica en cisteína, situada en la subunidad α , y la parte C-terminal de la subunidad β . Las diferencias de secuencias observadas en la subunidad α se sitúan en la zona de unión de los ligandos, y están por lo tanto en el origen de las afinidades relativas del IGF-IR y del IR para los IGF y la insulina, respectivamente. Las diferencias en la parte C-terminal de la subunidad δ dan como resultado una divergencia en las vías de señalización de los dos receptores; mediando el IGF-IR efectos mitogénicos, de diferenciación y de antiapoptosis, mientras que la activación del IR implica principalmente efectos a nivel de las vías metabólicas (Baserga *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1332: F105-126, 1997; Baserga R., Exp. Cell. Res., 253: 1-6, 1999).

Las proteínas de tirosina quinasas citoplásmicas son activadas mediante la unión del ligando al dominio extracelular del receptor. La activación de las quinasas, a su vez, implica la estimulación de diferentes sustratos intracelulares, incluyendo IRS-1, IRS-2, Shc y Grb 10 (Peruzzi F. *et al.*, J. Cancer Res. Clin. Oncol., 125: 166-173, 1999). Los dos sustratos principales del IGF-IR son IRS y Shc que median, mediante la activación de numerosos efectores en dirección 3', la mayoría de los efectos de crecimiento y de diferenciación relacionados con la unión de los IGF a este receptor (figura 2). La disponibilidad de sustratos puede determinar, en consecuencia, el efecto biológico final relacionado con la activación del IGF-IR. Cuando predomina IRS-1, las células tienden a proliferar y a transformarse. Cuando domina Shc, las células tienden a diferenciarse (Valentinis B. *et al.*, J. Biol. Chem. 274: 12423-12430, 1999). Parecer ser que la vía que interviene principalmente en los efectos de protección contra la apoptosis es la vía de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI 3-quinasa) (Prisco M. *et al.*, Horm. Metab. Res., 31: 80-89, 1999; Peruzzi F. *et al.*, J. Cancer Res. Clin. Oncol., 125: 166-173, 1999).

La función del sistema de IGF en carcinogénesis ha sido el tema de investigaciones intensas en los últimos diez años. Este interés siguió al descubrimiento del hecho de que, además de sus propiedades mitogénicas y antiapoptóticas, parece que se requiere el IGF-IR para el establecimiento y el mantenimiento de un fenotipo transformado. En efecto, se ha establecido bien que una sobreexpresión o una activación constitutiva del IGF-IR lleva, en una gran variedad de células, a un crecimiento de las células independientes del soporte en medios que carecen de suero de ternera fetal, y a la formación de tumores en ratones atímicos. Esta no es en sí misma una propiedad única, puesto que una gran variedad de productos de genes sobreexpresados puede transformar células, incluyendo un buen número de receptores de factores de crecimiento. Sin embargo, el descubrimiento crucial que ha demostrado claramente la importante función desempeñada por el IGF-IR en la transformación, ha sido la demostración de que las células R-, en las cuales el gen que codifica el IGF-IR ha sido desactivado, son totalmente refractarias a la transformación por diferentes agentes que son usualmente capaces de transformar las células, tales como la proteína E5 del virus del papiloma bovino, una sobreexpresión del EGFR o del PDGFR, el antígeno T de SV 40, ras activado, o la combinación de estos dos últimos factores (Sell C. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90: 11217-11221, 1993; Sell C. *et al.*, Mol. Cell. Biol., 14: 3604-3612, 1994; Morrione A. J., Virol., 69: 5300-5303, 1995; Coppola D. *et al.*, Mol. Cell. Biol., 14: 4588-4595, 1994; DeAngelis T *et al.*, J. Cell. Physiol., 164: 214-221, 1995).

El IGF-IR se expresa en una gran variedad de tumores y de líneas tumorales, y los IGF amplifican el crecimiento del tumor vía su unión al IGF-IR. Otros argumentos a favor de la función del IGF-IR en carcinogénesis provienen de estudios que usan anticuerpos monoclonales murinos dirigidos contra el receptor, o el uso de dominantes negativos del IGF-IR. En efecto, los anticuerpos monoclonales murinos dirigidos contra el IGF-IR inhiben la proliferación de numerosas líneas celulares en cultivo, y el crecimiento de células tumorales *in vivo* (Arteaga C. *et al.*, Cancer Res., 49: 6237-6241, 1989; Li *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Com., 196: 92-98, 1993; Zia F *et al.*, J. Cell. Biol., 24: 269-275, 1996; Scotlandi K *et al.*, Cancer Res., 58: 4127-4131, 1998). Se ha mostrado igualmente, en los trabajos de Jiang *et al.* (Oncogene, 18: 6071-6077, 1999), que un dominante negativo del IGF-IR es capaz de inhibir la proliferación tumoral.

La presente invención tiene por objeto poder disponer de un anticuerpo monoclonal murino, preferentemente un anticuerpo quimerizado o humanizado, que reconocerá específicamente y con gran afinidad al IGF-IR. Este anticuer-

po interactuará poco o nada con el receptor IR de insulina. Su unión será capaz de inhibir *in vitro* el crecimiento de tumores que expresan el IGF-IR, interactuando principalmente con las vías de transducción de señales activadas durante las interacciones IGF1/IGF-IR e IGF2/IGF-IR. Este anticuerpo será capaz de ser activo *in vivo* en todos los tipos de tumores que expresan el IGF-IR, incluyendo los tumores de mama y de próstata dependientes de estrógeno, que no es el caso para los anticuerpos monoclonales anti-IGF-IR (escritos como AcM o ACM) disponibles actualmente. En efecto, el α IR3, que hace referencia al dominio del IGF-IR, inhibe totalmente *in vitro* el crecimiento de tumores de mama dependiente de estrógeno (MCF-7), pero carece de efecto sobre el modelo correspondiente *in vivo* (Arteaga C. *et al.*, J. Clin. Invest. 84: 1418-1423, 1989). Además, el fragmento scFv-Fc, derivado del anticuerpo monoclonal murino 1H7, es sólo débilmente activo en el tumor de mama MCF-7, y totalmente inactivo sobre un tumor de próstata independiente de andrógenos (Li S. L. *et al.*, Cancer Immunol. Immunother., 49: 243-252, 2000).

De manera sorprendente, se ha demostrado un anticuerpo quimérico (denominado C7C10), y dos anticuerpos humanizados, denominados respectivamente forma humanizada 1 de h7C10 y forma humanizada 2 de h7C10, derivados del anticuerpo monoclonal murino 7C10, que reconoce el IGF-IR y que responde a todos los criterios enunciados aquí arriba, es decir, a un no reconocimiento del receptor de insulina, a un bloqueo *in vitro* de la proliferación inducida por IGF1 y/o IGF2, pero igualmente a la inhibición *in vivo* del crecimiento de diferentes tumores que expresan el IGF-IR, entre los cuales están un osteosarcoma y un tumor pulmonar de células no pequeñas, pero igualmente, y más particularmente, el tumor de mama MCF-7 dependiente de estrógeno, y un tumor de próstata DU-145 independiente de andrógenos. Además, y de manera sorprendente, la intensidad de inhibición del crecimiento de tumores de las células MCF-7 *in vivo* por el anticuerpo 7C10 es comparable, incluso significativamente superior, a la observada con tamoxifeno, uno de los compuestos de referencia en el tratamiento de tumores de mama dependientes de estrógeno. Por otra parte, se ha demostrado que estos anticuerpos inhiben la fosforilación de la tirosina de la cadena beta del IGF-IR y de IRS1, el primer sustrato del receptor. Además, se ha establecido igualmente que estos anticuerpos provocan la incorporación de dicho receptor y su degradación de forma contraria a lo que se observa usualmente con los ligandos naturales que permiten la recirculación rápida del receptor sobre la superficie de las células. Se ha podido caracterizar estos anticuerpos mediante su secuencia peptídica y nucleica, especialmente por la secuencia de sus regiones que determinan su complementariedad (CDR) por el IGF-IR.

De esta manera, según una primera forma de realización, la presente invención tiene por objeto un anticuerpo aislado, o uno de sus fragmentos funcionales, siendo dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos capaz de unirse específicamente al receptor del factor de crecimiento humano I de tipo insulina IGF-IR, caracterizado porque comprende una cadena ligera que comprende las tres CDR de secuencia de aminoácidos SEC ID n° 2, 4 y 6, y porque comprende una cadena pesada que comprende las tres CDR de secuencia de aminoácidos SEC ID n° 8, 10 y 12.

En la presente descripción, los términos “unirse” y “fijarse” tienen el mismo significado y son intercambiables.

En la presente descripción, los términos polipéptidos, secuencias polipeptídicas, péptidos y proteínas unidos a compuestos de anticuerpos o a su secuencia, son intercambiables.

Se debe de entender aquí que la invención no se refiere a los anticuerpos en forma natural, es decir, no están en su ambiente natural, pero se ha podido aislarlos u obtenerlos mediante purificación de fuentes naturales, o se han podido obtener también mediante recombinación genética, o mediante síntesis química, y pueden contener entonces aminoácidos no naturales tal como se describirá más adelante.

Por región CDR o CDR, se pretende indicar las regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas, tal como se define por Kabat *et al.* (Kabat *et al.*, Sequences of proteins of immunological interest, 5ª. ed., U. S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, y últimas ediciones). Existen 3 CDR de cadena pesada y 3 CDR de cadena ligera. El término “CDR” o “los CDR” se usa aquí para designar, según los casos, una de estas regiones o varias regiones, o incluso el conjunto de estas regiones, que contienen la mayoría de los restos de aminoácido responsables de la unión por afinidad del anticuerpo al antígeno o al epítipo al cual reconoce.

Los anticuerpos según la presente invención son, preferentemente, anticuerpos monoclonales específicos, especialmente murino, quiméricos o humanizados, los cuales se pueden obtener según los métodos estándares bien conocidos por los expertos en la técnica.

Generalmente, para la preparación de anticuerpos monoclonales o sus fragmentos funcionales, especialmente murino, es posible referirse a técnicas que se describen, en particular, en el manual “Antibodies” (Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, p. 726, 1988), o a la técnica de preparación a partir de hibridomas descrita por Kohler y Milstein (Nature, 256: 495-497, 1975).

Los anticuerpos monoclonales según la invención se pueden obtener, por ejemplo, a partir de una célula animal inmunizada contra el receptor IGF-IR, o uno de sus fragmentos que contiene el epítipo reconocido específicamente por dichos anticuerpos monoclonales según la invención. Dicho receptor IGF-IR, o uno de sus fragmentos, se puede producir especialmente según los métodos de realización usuales, mediante recombinación genética a partir de una secuencia de ácido nucleico contenida en la secuencia de ADNc que codifica el receptor IGF-IR, o mediante síntesis peptídica a partir de una secuencia de aminoácidos comprendida en la secuencia peptídica del receptor IGF-IR.

ES 2 283 759 T3

Los anticuerpos monoclonales según la invención se pueden purificar, por ejemplo, sobre una columna de afinidad sobre la cual, previamente, se inmovilizó el receptor IGF-IR o uno de sus fragmentos que comprende el epítipo reconocido específicamente mediante dichos anticuerpos monoclonales según la invención. Más particularmente, dichos anticuerpos monoclonales se pueden purificar mediante cromatografía sobre proteína A y/o G, seguida o no de una cromatografía de intercambio iónico, que tiene por objetivo eliminar los contaminantes proteicos residuales, así como el ADN y los LPS, ella misma seguida o no de una cromatografía de exclusión sobre gel de Sefarosa, a fin de eliminar los agregados potenciales debido a la presencia de dímeros o de otros multímeros. De manera todavía más preferida, el conjunto de estas técnicas se puede usar simultánea o sucesivamente.

Mediante la expresión “anticuerpos según la invención”, se incluyen igualmente anticuerpos quiméricos o humanizados.

Mediante la expresión “anticuerpo quimérico”, se pretende designar un anticuerpo que contiene una región variable natural (cadena ligera y cadena pesada) derivada de un anticuerpo de una especie determinada, en combinación con las regiones constantes de cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo de una especie heteróloga a dicha especie determinada.

Los anticuerpos o sus fragmentos de tipo quimérico según la invención se pueden preparar usando las técnicas de recombinación genética. Por ejemplo, el anticuerpo quimérico se puede producir clonando un ADN recombinante que contiene un promotor y una secuencia que codifica la región variable de un anticuerpo monoclonal no humano, especialmente murino, según la invención, y una secuencia que codifica la región constante del anticuerpo humano. Un anticuerpo quimérico de la invención codificado por tal gen recombinante será, por ejemplo, una quimera de ratón-hombre, estando la especificidad de este anticuerpo determinada por la región variable derivada del ADN murino, y estando su isotipo determinado por la región constante derivada del ADN humano. Para los métodos de preparación de anticuerpos quiméricos es posible, por ejemplo, referirse al documento de Verhoeven *et al.* (BioEssays, 8: 74, 1988).

Mediante la expresión “anticuerpos humanizados”, se pretende designar un anticuerpo que contiene regiones CDR derivadas de un anticuerpo de origen no humano, siendo las otras partes de la molécula de anticuerpo derivadas de uno (o varios) anticuerpos humanos. Además, algunos de los restos de los segmentos del esqueleto (denominados FR) se pueden modificar para conservar la afinidad de la unión (Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525, 1986; Verhoeven *et al.*, Science, 239: 1534-1536, 1988; Riechmann *et al.*, Nature, 332: 323-327, 1988).

Los anticuerpos humanizados según la invención, o sus fragmentos, se pueden preparar mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica (tales como, por ejemplo, las descritas en los documentos Singer *et al.*, J. Immun. 150: 2844-2857, 1992; Mountain *et al.*, Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10: 1-142, 1992; o Bebbington *et al.*, Bio/Technology, 10: 169-175, 1992). Se prefieren tales anticuerpos humanizados según la invención para su uso en métodos de diagnóstico *in vitro*, o en tratamiento profiláctico y/o terapéutico *in vivo*.

Mediante la expresión “fragmento funcional de un anticuerpo según la invención”, se pretende designar, en particular, un fragmento de anticuerpo, tales como los fragmentos Fv, scFv (sc para cadena sencilla), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc, o pequeños fragmentos de anticuerpos bivalentes y específicos, o cualquier fragmento cuya semivida habría sido incrementada mediante modificación química, tal como la adición de poli(alquilen)glicol, tal como poli(etilen)glicol (“PEGilación”) (fragmentos pegilados denominados Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG o Fab'-PEG) (“PEG” por poli(etilen)glicol), o por incorporación en un liposoma, presentando dichos fragmentos las tres CDR de secuencia SEC ID n° 2, 4 y 6, y las tres CDR de secuencia SEC ID n° 8, 10 y 12 según la invención, y, especialmente, porque es capaz de ejercer de manera general una actividad incluso parcial del anticuerpo del cual procede, tal como en particular la capacidad para reconocer y unirse al receptor IGF-IR y, cuando sea apropiado, para inhibir la actividad del receptor IGF-IR.

Preferentemente, dichos fragmentos funcionales estarán constituidos o comprenderán una secuencia parcial de la cadena variable pesada o ligera del anticuerpo del cual derivan, siendo dicha secuencia parcial suficiente para retener la misma especificidad de unión que el anticuerpo del cual deriva, y una afinidad suficiente, preferentemente por lo menos igual a 1/100, de manera más preferida a por lo menos 1/10, de la del anticuerpo del cual deriva, con respecto al receptor IGF-IR.

Tal fragmento funcional contendrá como mínimo 5 aminoácidos, preferentemente 10, 15, 25, 50 y 100 aminoácidos consecutivos de la secuencia del anticuerpo del cual deriva.

Preferentemente, estos fragmentos funcionales serán fragmentos de tipo Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, F(ab'), scFv-Fc o pequeños fragmentos de anticuerpos bivalentes y específicos, los cuales tienen generalmente la misma especificidad de unión que el anticuerpo del cual derivan. Los fragmentos de anticuerpo de la invención se pueden obtener a partir de anticuerpos tales como los descritos anteriormente, mediante métodos tales como la digestión por enzimas, tales como pepsina o papaína, y/o mediante ruptura de los puentes de disulfuro mediante reducción química. De otra manera, los fragmentos de anticuerpos abarcados en la presente invención se pueden obtener mediante técnicas de recombinación genética bien conocidas por los expertos en la técnica, o también mediante síntesis peptídica mediante, por ejemplo, sintetizadores automáticos de péptidos, tales como los provistos por la compañía Applied Biosystems, etc.

De manera más preferida, los anticuerpos, o sus fragmentos funcionales, según la presente invención, son anticuerpos quiméricos o humanizados. Se pueden obtener mediante recombinación genética o mediante síntesis química.

Entre las seis secuencias de CDR cortas, la tercera CDR de la cadena pesada (CDRH3) tiene una mayor variabilidad de tamaño (mayor diversidad, esencialmente debida a los mecanismos de disposición de los genes que darán lugar a la misma). Puede ser también tan corta como 2 aminoácidos, mientras que el tamaño más largo conocido es 26. Funcionalmente, la CDRH3 desempeña una función en parte en la determinación de la especificidad del anticuerpo (Segal *et al.*, PNAS, 71: 4298-4302, 1974; Amit *et al.*, Science, 233: 747-753, 1986; Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196: 901-917, 1987; Chothia *et al.*, Nature, 342: 877-883, 1989; Caton *et al.*, J. Immunol., 144: 1965-1968, 1990; Sharon *et al.*, PNAS, 87: 4814-4817, 1990; Sharon *et al.*, J. Immunol., 144: 4863-4869, 1990; Kabat *et al.*, J. Immunol., 147: 1709-1719, 1991).

Se sabe que sólo un bajo porcentaje de los aminoácidos de las CDR contribuye a la construcción de un sitio de unión al anticuerpo, pero estos restos deben mantenerse en una conformación tridimensional muy específica.

Según otro aspecto, la invención se refiere a un hibridoma murino capaz de segregar un anticuerpo monoclonal según la presente invención, especialmente el hibridoma murino tal como el depositado en el Centre National de Culture De Microorganisme (CNCM) (Instituto Pasteur, París, Francia) el 19 de septiembre de 2001, con el número 1-2717.

El anticuerpo monoclonal denominado aquí 7C10, o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque dicho anticuerpo es segregado por el hibridoma depositado en el CNCM el 19 de septiembre de 2001 bajo el número 1-2717 es, por supuesto, parte de la presente invención.

En un modo de realización particular, la presente invención se refiere a un anticuerpo murino, o uno de sus fragmentos funcionales, según la invención, caracterizado porque dicho anticuerpo comprende una cadena ligera de secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 54, y porque comprende una cadena pesada de secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 69.

Según un aspecto igualmente particular, la presente invención se refiere a un anticuerpo quimérico, o uno de sus fragmentos funcionales, según la invención, caracterizado porque dicho anticuerpo comprende además las regiones constantes de cadena ligera y cadena pesada derivadas de un anticuerpo de una especie heteróloga al ratón, especialmente del ser humano, y, preferentemente, porque las regiones constantes de cadena ligera y de cadena pesada derivadas de un anticuerpo humano son, respectivamente, la región kappa y gamma-1, gamma-2 o gamma-4.

Según un aspecto igualmente particular, la presente invención se refiere a un anticuerpo humanizado o uno de sus fragmentos funcionales, según la invención, caracterizado porque dicho anticuerpo comprende una cadena ligera y/o una cadena pesada, en las cuales los segmentos del esqueleto FR1 a FR4 (tales como se definen más adelante en los ejemplos 12 y 13, en las tablas 5 y 6) de dicha cadena ligera y/o cadena pesada derivan, respectivamente, de los segmentos del esqueleto FR1 a FR4 de cadena ligera y/o cadena pesada de anticuerpos humanos.

Según un modo de realización preferido, el anticuerpo humanizado o uno de sus fragmentos funcionales, según la presente invención, se caracteriza porque dicho anticuerpo humanizado comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 61 ó 65, o porque comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 75, 79 u 83.

Preferentemente, el anticuerpo humanizado, o uno de sus fragmentos funcionales, según la invención, se caracteriza porque dicho anticuerpo humanizado comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 65, y porque comprende una cadena pesada de secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 79 u 83, preferentemente SEC ID nº 83.

Según un nuevo aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado, caracterizado porque se selecciona de los siguientes ácidos nucleicos:

- a) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, según la invención;
- b) un ácido nucleico complementario de un ácido nucleico tal como se define en a); y
- c) un ácido nucleico de al menos 18 nucleótidos capaz de hibridarse bajo condiciones muy restrictivas con, por lo menos, una de las CDR de secuencia de ácido nucleico SEC ID nº 1, 3, 5, 7, 9 u 11.

Mediante las expresiones “ácido nucleico”, “secuencia nucleica” o “ácido nucleico”, “polinucleótido”, “oligonucleótido”, “secuencia de polinucleótidos”, “secuencia de nucleótidos”, términos que se usarán indistintamente en la presente descripción, se pretende designar un enlace preciso de nucleótidos, modificados o no modificados, que permiten definir un fragmento o una región de un ácido nucleico, que contiene o no nucleótidos no naturales, y pudiendo corresponder tanto a un ADN bicatenario, un ADN monocatenario, como a productos de transcripción de dichas moléculas de ADN.

ES 2 283 759 T3

Se debe de entender también aquí que la presente invención no se refiere a las secuencias nucleotídicas en su ambiente cromosómico natural, es decir, en el estado natural. Se trata de secuencias que se han aislado y/o purificado, es decir, que se han seleccionado directamente o indirectamente, por ejemplo, mediante copia, modificándose al menos parcialmente su entorno. Así, se pretende designar aquí los ácidos nucleicos aislados obtenidos mediante recombinação genética mediante, por ejemplo, células hospedantes, u obtenidos mediante síntesis química.

Una hibridación bajo condiciones muy restrictivas significa que las condiciones de temperatura y de fuerza iónica se seleccionan de tal manera que permiten el mantenimiento de la hibridación entre dos fragmentos de ADN complementarios. A título ilustrativo, condiciones muy restrictivas de la etapa de hibridación con el fin de definir los fragmentos polinucleotídicos descritos aquí arriba son, ventajosamente, las siguientes.

La hibridación de ADN-ADN o ADN-ARN se lleva a cabo en dos etapas: (1) prehibridación a 42°C durante 3 horas en un tampón de fosfato (20 mM, pH 7,5), que contiene 5 x SSC (1 x SSC corresponde a una disolución de 0,15 M de NaCl + 0,015 M de citrato de sodio), 50% de formamida, 7% de dodecilsulfato de sodio (SDS), 10 x de disolución de Denhardt, 5% de sulfato de dextrano y 1% de ADN de esperma de salmón; (2) hibridación real durante 20 horas a una temperatura que depende del tamaño de la sonda (es decir: 42°C, para un tamaño de sonda > 100 nucleótidos), seguida de 2 lavados de 20 minutos a 20°C en 2 x SSC + 2% de SDS, 1 lavado de 20 minutos a 20°C en 0,1 x SSC + 0,1% de SDS. El último lavado se lleva a cabo en 0,1 x SSC + 0,1% de SDS durante 30 minutos a 60°C, para un tamaño de sonda > 100 nucleótidos. Las condiciones de hibridación muy restrictivas descritas aquí arriba para un polinucleótido de tamaño definido se pueden adaptar por los expertos en la técnica para oligonucleótidos de tamaño más grande o más pequeño, según las enseñanzas de Sambrook *et al.*, (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2ª ed. Cold Spring Harbor).

La invención se refiere igualmente a un vector que comprende un ácido nucleico según la presente invención.

La invención tiene especialmente por objeto vectores de clonación y/o expresión que contienen una secuencia nucleotídica según la invención.

Los vectores según la invención comprenden, preferentemente, elementos que permiten la expresión y/o la secreción de las secuencias nucleotídicas en una célula hospedante determinada. El vector debe contener por lo tanto un promotor, señales de inicio y terminación de la traducción, así como regiones apropiadas de regulación de la transcripción. Debe ser capaz de poderse mantener de manera estable en la célula hospedante, y puede tener, eventualmente, señales particulares que especifiquen la secreción de la proteína traducida. Estos elementos diferentes se eligen y optimizan por los expertos en la técnica en función de la célula hospedante usada. Para este fin, las secuencias nucleotídicas según la invención se pueden insertar en vectores de replicación autónoma en el hospedante elegido, o pueden ser vectores integrantes del hospedante elegido.

Tales vectores se preparan mediante métodos usados comúnmente por los expertos en la técnica, y los clones resultantes se pueden introducir en un hospedante apropiado mediante métodos estándares, tales como lipofección, electroporación, choque térmico o métodos químicos.

Los vectores según la invención son, por ejemplo, vectores de origen plasmídico o vírico. Son útiles para transformar células hospedantes a fin de clonar o expresar las secuencias nucleotídicas según la invención.

La invención comprende igualmente las células hospedantes que comprenden un vector según la invención.

El hospedante celular se puede seleccionar de sistemas procariotas o eucariotas, por ejemplo, células bacterianas, pero igualmente células de levadura o células de animales, en particular células de mamíferos. También es posible usar células de insectos o células vegetales.

En otro aspecto, la invención tiene por objeto un procedimiento para la producción de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales según la invención, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar en un medio y condiciones de cultivo adecuados una célula hospedante según la invención; y
- b) recuperar dichos anticuerpos, o uno de sus fragmentos funcionales, así producidos a partir del medio de cultivo o de dichas células cultivadas.

Las células transformadas según la invención se pueden usar en procedimientos para la preparación de polipéptidos recombinantes según la invención. Los procedimientos para la preparación de un polipéptido según la invención en una forma recombinante, caracterizado porque usan un vector y/o una célula transformada por un vector según la invención, están por sí mismos abarcados en la presente invención. Preferentemente, se cultiva una célula transformada mediante un vector según la invención bajo condiciones que permiten la expresión de dicho polipéptido, y se recupera dicho péptido recombinante.

Tal como se ha dicho, el hospedante celular se puede seleccionar de sistemas procariotas o eucariotas. En particular, es posible identificar secuencias de nucleótidos según la invención, facilitando la secreción en tal sistema procariota o eucariota. Un vector según la invención que posee tal secuencia se puede usar, por lo tanto, ventajosamente, para

la producción de proteínas recombinantes, destinadas a ser segregadas. En efecto, la purificación de estas proteínas recombinantes de interés se facilitará por el hecho de que están presentes en el sobrenadante del cultivo celular, más que en el interior de las células hospedantes.

5 Igualmente, es posible preparar los polipéptidos según la invención mediante síntesis química. Tal procedimiento de preparación es igualmente un objeto de la invención. El experto en la técnica conoce los procedimientos de síntesis química, por ejemplo, las técnicas que usan fases sólidas (véase especialmente Steward *et al.*, 1984, Solid phase peptide synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2ª ed., (1984)), o técnicas que usan fases sólidas parciales, mediante condensación de fragmentos o mediante una síntesis clásica en disolución. Los polipéptidos obtenidos
10 mediante síntesis química, y que pueden comprender aminoácidos no naturales correspondientes, están abarcados igualmente en la invención.

Los anticuerpos, o uno de sus fragmentos funcionales, susceptibles de ser obtenidos mediante un procedimiento según la invención, están igualmente abarcados en la presente invención.

15 Según otro aspecto, la invención tiene por objeto un anticuerpo humanizado, o uno de sus fragmentos funcionales, según la invención, como un medicamento, preferentemente un anticuerpo humanizado tal como se define anteriormente. Por término anticuerpo, para el resto de la presente descripción, se debe de entender un anticuerpo anti-IGF-IR, así como un anticuerpo anti-IGF-IR/EGFR biespecífico.

20 La invención se refiere igualmente a una composición farmacéutica que comprende como principio activo un compuesto que consiste en un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales según la invención, al que se le añade, preferentemente, un excipiente y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 La presente invención comprende además el uso de la composición según la invención, para la preparación de un medicamento.

Más particularmente, se describe el uso de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, y/o de una composición, para la preparación de un medicamento destinado a la prevención o al tratamiento de una enfermedad inducida
30 por una sobreexpresión y/o una activación anormal del receptor IGF-IR y/o relacionada con una hiperactivación de la vía de transducción de señales mediada por la interacción del I-IGF1 o IGF2 con IGF-IR.

Preferentemente, la administración de dicho medicamento no induce, o induce poco, efectos secundarios relacionados con la inhibición del receptor de insulina IR, es decir, inhibición de la interacción del receptor IR con sus ligandos
35 naturales debido a la presencia de dicho medicamento, especialmente mediante una inhibición competitiva relacionada con la unión de dicho medicamento al IR.

La presente invención describe el uso de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, preferentemente humanizado, y/o de una composición según la invención, para la preparación de un medicamento destinado a inhibir
40 la transformación de células normales en células con carácter tumoral, preferentemente células dependientes del IGF, especialmente células dependientes del IGF1 y/o el IGF2.

La presente invención describe igualmente el uso de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, preferentemente humanizado, y/o de una composición según la invención, para la preparación de un medicamento destinado
45 a inhibir el crecimiento y/o la proliferación de células tumorales, preferentemente células dependientes del IGF, especialmente células dependientes del IGF1 y/o el IGF2.

De manera general, la presente invención tiene por objeto el uso de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, preferentemente humanizados, y/o de una composición según la invención, para la preparación de un medicamento
50 destinado a la prevención o al tratamiento de cáncer. Preferentemente, se describen los cánceres que expresan el IGF-IR y/o que presentan una hiperactivación de la vía de transducción de señales mediada por la interacción del IGF1 o el IGF2 con el IGF-IR, tal como, por ejemplo, la sobreexpresión de IRS1.

Se describe igualmente aquí el uso de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, preferentemente humanizado, y/o de una composición según la invención, para la preparación de un medicamento destinado a la
55 prevención o al tratamiento de psoriasis, psoriasis cuya hiperproliferación epidérmica se puede relacionar con la expresión o la sobreexpresión del IGF-IR, y/o con la hiperactivación de la vía de transducción de señales mediada por la interacción del IGF-IR con sus ligandos naturales (Wraight C. J. *et al.* Nat. Biotechnol., 2000, 18(5): 521-526. Reversal of epidermal hyperproliferation in psoriasis by insulin-like growth factor I receptor antisense oligonucleotides).

Entre los cánceres que se pueden prevenir y/o tratar, se prefiere el cáncer de próstata, los osteosarcomas, el cáncer del pulmón, el cáncer de mama. Se puede igualmente citar el cáncer endometrial o el cáncer de colon, o cualquier otro
60 cáncer que sobreexpresa el IGF-IR.

Según aún otro aspecto, la presente invención tiene por objeto un método de diagnóstico, preferiblemente *in vitro*, de enfermedades relacionadas con una sobreexpresión o una subexpresión, preferiblemente una sobreexpresión, del receptor IGF-IR, a partir de una muestra biológica en la cual se sospeche la presencia anormal del receptor IGF-

IR, caracterizado porque dicha muestra biológica se pone en contacto con un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, según la invención, pudiendo ser marcado dicho anticuerpo, cuando sea apropiado.

Preferentemente, dichas enfermedades relacionadas con la sobreexpresión del receptor IGF-IR en dicho método de diagnóstico serán cánceres.

Dicho anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, se puede presentar en forma de un inmunocóncugado o de un anticuerpo marcado, a fin de obtener una señal detectable y/o cuantificable.

Los anticuerpos marcados según la invención, o sus fragmentos funcionales incluyen, por ejemplo, anticuerpos denominados inmunocóncugados que se pueden cóncugar, por ejemplo, con enzimas tales como peroxidasa, fosfatasa alcalina, α -D-galactosidasa, glucosa oxidasa, glucosa amilasa, anhidrasa carbónica, acetilcolinesterasa, lisozima, malato deshidrogenasa o glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, o mediante una molécula tal como biotina, digoxigenina, o 5-bromodesoxiuridina. Se pueden igualmente cóncugar marcadores fluorescentes con los anticuerpos o con sus fragmentos funcionales según la invención, e incluyen especialmente fluoresceína y sus derivados, fluorocromo, rodamina y sus derivados, GFP (GFP por "proteína fluorescente verde"), dansilo, umbeliferona, etc. En tales cóncugados, los anticuerpos de la invención o sus fragmentos funcionales se pueden preparar mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Se pueden acoplar a las enzimas o a los marcadores fluorescentes directamente o mediante el intermedio de un grupo espaciador o de un grupo de unión tal como un polialdehído, tal como glutaraldehído, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DPTA), o en presencia de agentes de acoplamiento tales como los citados anteriormente para los cóncugados terapéuticos. Los cóncugados que contienen marcadores de tipo fluoresceína se pueden preparar mediante reacción con un isotiocianato.

Otros cóncugados pueden incluir igualmente marcadores quimioluminiscentes tales como luminol y los dioxetanos, marcadores bioluminiscentes tales como luciferasa y luciferina, o también marcadores radiactivos tales como yodo¹²³, yodo¹²⁵, yodo¹²⁶, yodo¹³³, bromo⁷⁷, tecnecio^{99m}, indio¹¹¹, indio^{113m}, galio⁶⁷, galio⁶⁸, rutenio⁹⁵, rutenio⁹⁷, rutenio¹⁰³, rutenio¹⁰⁵, mercurio¹⁰⁷, mercurio²⁰³, renio^{99m}, renio¹⁰¹, renio¹⁰⁵, escandio⁴⁷, telurio^{121m}, telurio^{122m}, telurio^{125m}, tulio¹⁶⁵, tulio¹⁶⁷, tulio¹⁶⁸, flúor¹⁸, itrio¹⁹⁹ y yodo¹³¹. Los métodos conocidos por los expertos en la técnica que existen para el acoplamiento de los radioisótopos terapéuticos a los anticuerpos, directamente o mediante un agente quelante tal como EDTA o DTPA mencionados anteriormente, se pueden usar para los radioelementos que se pueden usar en diagnóstico. Se puede igualmente citar el marcado con Na[I¹²⁵] mediante el método de cloramina T [Hunter W. M. y Greenwood F. C. (1962) Nature 194: 495], o también con tecnecio^{99m} mediante la técnica de Crockford *et al.* (Patente US 4.424.200), o unidos mediante DTPA como se describe por Hnatowich (patente US 4.479.930).

De esta manera, los anticuerpos, o sus fragmentos funcionales, según la invención, se pueden usar en un procedimiento para la detección y/o la cuantificación de una sobreexpresión o de una subexpresión, preferentemente una sobreexpresión, del receptor IGF-IR y/o EGFR en una muestra biológica, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- a) poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, según la invención; y
- b) demostrar el complejo IGF-IR y/o EGFR/anticuerpo eventualmente formado.

Los anticuerpos, o sus fragmentos funcionales, según la invención, se podrán usar en un procedimiento para la detección y/o la cuantificación del receptor IGF-IR y/o EGFR en una muestra biológica, para el monitoreo de la eficacia de un tratamiento profiláctico y/o terapéutico de cáncer dependiente del IGF, o también de psoriasis.

Más generalmente, los anticuerpos, o sus fragmentos funcionales, descritos aquí se pueden usar en forma ventajosa en cualquier situación en la que la expresión de receptor IGF-IR se debe de observar de manera cualitativa y/o cuantitativa.

Preferentemente, la muestra biológica está constituida por un fluido biológico, tal como suero, sangre entera, células, una muestra de tejido o biopsias de origen humano.

Cualquier procedimiento o ensayo convencional se puede usar para llevar a cabo dicha detección y/o dosificación. Dicho ensayo puede ser un ensayo de competencia o en sándwich, o cualquier ensayo conocido por los expertos en la técnica que dependa de la formación de un complejo inmune de tipo anticuerpo-antígeno. Siguiendo las aplicaciones según la invención, el anticuerpo o uno de sus fragmentos funcionales se puede inmovilizar o marcar. Esta inmovilización se puede realizar sobre numerosos soportes conocidos por los expertos en la técnica. Estos soportes pueden incluir especialmente vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, o células naturales o modificadas. Estos soportes pueden ser solubles o insolubles.

A título de ejemplo, un método preferido usa procedimientos inmunoenzimáticos según la técnica de ELISA, mediante inmunofluorescencia, o técnica de radioinmunoensayo (RIA), o su equivalente.

De esta manera, la presente invención comprende igualmente los kits o estuches necesarios para llevar a cabo un método de diagnóstico de enfermedades inducidas por una sobreexpresión o una subexpresión del receptor IGF-

IR, o para llevar a cabo un procedimiento para la detección y/o la cuantificación de una sobreexpresión o de una subexpresión del receptor IGF-IR en una muestra biológica, preferentemente una sobreexpresión, de dicho receptor, caracterizado porque dicho kit o estuche comprende los siguientes elementos:

- a) un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, según la invención;
- b) eventualmente, los reactivos para la constitución del medio favorable para la reacción inmunológica;
- c) eventualmente, los reactivos que permiten la demostración de los complejos de IGF-IR/anticuerpo producidos mediante la reacción inmunológica.

La invención describe igualmente el uso de un anticuerpo según la invención, para la preparación de un medicamento destinado a la detección de diana específica de un compuesto biológicamente activo a células que expresan o sobreexpresan el receptor IGF-IR.

Se pretende designar aquí mediante la expresión “compuesto biológicamente activo” cualquier compuesto capaz de modular, especialmente de inhibir, la actividad celular, en particular su crecimiento, su proliferación, transcripción o traducción de genes.

La invención describe también un reactivo de diagnóstico *in vivo* que comprende un anticuerpo según la invención, o uno de sus fragmentos funcionales, preferentemente marcado, especialmente radiomarcado, y su uso en formación de imágenes médicas, en particular para la detección de cáncer relacionado con la expresión o la sobreexpresión, por una célula, del receptor IGF-IR.

En la presente descripción, se pretende que la expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” designe un compuesto o una combinación de compuestos que entran en una composición farmacéutica sin provocar reacciones secundarias, y que permite, por ejemplo, facilitar la administración del o de los compuestos activos, un aumento de su vida y/o de su eficacia en el organismo, el aumento de su solubilidad en disolución, o también la mejora de su conservación. Estos vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos, y se adaptaron por los expertos en la técnica en función de la naturaleza y del modo de administración del o de los compuestos activos elegidos.

Preferentemente, estos compuestos se administrarán mediante la vía sistémica, en particular por vía intravenosa, por vía intramuscular, intradérmica, intraperitoneal o subcutánea, o mediante vía oral. De manera más preferida, la composición que comprende los anticuerpos según la invención se administrará varias veces, de forma secuencial.

Sus modos de administración, dosificaciones y formas galénicas óptimas, se pueden determinar según los criterios considerados generalmente en el establecimiento de un tratamiento adaptado para un paciente tales como, por ejemplo, la edad o el peso corporal del paciente, la gravedad de su estado general, la tolerancia al tratamiento, y los efectos secundarios observados.

Otras características y ventajas de la invención aparecen a continuación en la descripción con los ejemplos y las figuras, cuyas leyendas se representan a continuación:

Leyenda de las figuras

Figura 1: Representación esquemática del IGF-IR.

Figura 2: Esquema de la transducción de señales mediada por el IGF-IR durante la unión a IGF.

Figuras 3A, 3B y 3C: Reconocimiento del IGF-IR nativo expresado sobre la superficie de las células MCF-7 por el anticuerpo monoclonal 7C10.

Para este experimento, las células MCF-7 se incuban con el anticuerpo 7C10, o con un anticuerpo de control negativo, y después se recuperan con la ayuda de un anticuerpo secundario anti-especie fluorescente. El marcado se lee en un FACS. El primer histograma (figura 3A) corresponde a las células MCF-7 solas. En el segundo histograma (figura 3B), la curva no sombreada corresponde al marcado no específico por un anticuerpo murino isotipo de control. En el tercer histograma (figura 3C), la curva no sombreada muestra el reconocimiento del IGF-IR por el ACM 7C10.

Figuras 4A, 4B y 4C: Marcado de células de insectos Sf9 que expresan respectivamente el IGF-IR o el IR.

La figura 4A muestra el marcado de células no transfectadas solas (1), o células marcadas con anticuerpos monoclonales comerciales de control, que reconocen respectivamente el IGF-IR (2) o el IR (3). En la figura 4B, las células Sf9 que expresan únicamente el IGF-IR, se marcan con α IR3 (2) o anti-IR (3), el valor máximo (1) representa las células individuales. En la figura 4C, las células Sf9 que expresan únicamente el IR, se marcan con un anti-IR (3) o α IR3 (2), el valor máximo (1) representa las células individuales.

ES 2 283 759 T3

Figura 5: Efecto inhibitor del anticuerpo 7C10 sobre la proliferación de células MCF-7 inducida por el IGF-1.

Las células MCF-7 se incuban en presencia de concentraciones crecientes de IGF1 en presencia o en ausencia del ACM que se va a ensayar. La proliferación celular se evalúa siguiendo la incorporación de ³H-timidina. El anticuerpo comercial α IR3 se usa como un control positivo del experimento. La 7G3 es una IgG1 anti-IGF-IR murino sin actividad sobre la proliferación, se usa como un isotipo de control.

Figuras 6A, 6B y 6C:

- figura 6A: efecto *in vivo* del anticuerpo monoclonal 7C10 sobre el crecimiento de tumores MCF-7 establecidos en ratones atímicos;
- figuras 6B y 6C: figuras que proceden, respectivamente, de publicaciones de Arteaga *et al.* (J. Clin. Invest., 84, 1418-1423, 1989) y de Li *et al.* (Cancer Immunol. Immunother., 49, 243-252), y mostrando para la figura 6B el efecto de α IR3 murino (igualmente denominado α IR3), y para la figura 6C, el efecto de un scFv-Fc recombinante derivado del anticuerpo 1H7 sobre el crecimiento tumoral.

Figura 7: Estudio comparativo del efecto del AcM 7C10 y del tamoxifeno sobre el crecimiento *in vivo* del tumor MCF-7.

Figuras 8A, 8B y 8C: Estudio de la actividad antitumoral del anticuerpo murino 7C10 en diferentes modelos de xenoinjerto de células tumorales *in vivo*.

La figura 8A muestra los resultados obtenidos en un modelo de osteosarcoma SK-ES-1, la figura 8B se refiere a un tumor de próstata DU-145 independiente de andrógenos, y la figura 8C se refiere a un modelo de tumor pulmonar A549 de células no pequeñas. En estos tres modelos, el tratamiento se llevó a cabo dos veces por semana i.p. a razón de 250 μ g/dosis/ratón. Las curvas 7G3, EC2 y 9G4 corresponden, respectivamente, a tres IgG1 murinos usadas como un isotipo de control del experimento en cada uno de los modelos.

Figura 9: Estudio del efecto antitumoral del AcM 7C10 en comparación con navelbina (vinorelbina), así como la sinergia de los dos compuestos sobre el crecimiento *in vivo* de la línea A549.

Figura 10: Actividad comparativa de los AcM α IR3, 7C10 y 1H7 sobre la proliferación de células MCF-7 inducida por el IGF-2.

Figura 11: Comparación de los AcM 7C10 murino y el C7C10 quimérico para la inhibición de la proliferación de células MCF-7 inducida por el IGF1 *in vitro*. El anticuerpo 9G4 es una IgG1 murino usada como un isotipo control del experimento.

Figura 12: Efecto comparativo de los AcM 7C10 y h7C10 (humanizado 1, denominado aquí como 7H2HM) sobre el modelo *in vitro* de la proliferación de células MCF-7 inducida por el IGF1.

Figura 13: Efecto de los AcM 7C10 y h7C10 (humanizado 1, denominado aquí como 7H2HM) sobre la transducción de la señal inducida por el IGF1. La primera línea de puntos corresponde a la revelación, mediante un anticuerpo antifosforilación, de la fosforilación de la cadena β inmunoprecipitada a partir de células incubadas en presencia del IGF1 solo, o del IGF1 al que se le ha añadido anticuerpos que se van a ensayar. El 9G4 y el hIgG1 son, respectivamente, los isotipos de control de las formas 7C10 y h7C10 (denominadas igualmente como 7H2HM). La segunda línea de puntos corresponde a la revelación de la cadena β , y muestra que la cantidad depositada en todos los pocillos es perfectamente equivalente.

Figura 14: Secuencia del ADNc (SEC ID n° 48), de su hebra complementaria (SEC ID n° 50), y su traducción en aminoácidos (SEC ID n° 49), del fragmento de PCR amplificado a partir del hibridoma de ratón 7C10 con los cebadores MKV-1 y MKC, y que codifica el extremo 3' del péptido líder y 7C10 VL.

Figura 15: Secuencia del ADNc (SEC ID n° 51), de su hebra complementaria (SEC ID n° 53), y su traducción en aminoácidos (SEC ID n° 52), del fragmento de PCR amplificado a partir del hibridoma de ratón 7C10 con los cebadores MHV-12 y MHC-1, o MHV-8 y MHC-1, y que codifica el extremo 3' del péptido líder y 7C10 VH.

Figura 16: Reconocimiento del receptor IGF-1 por el anticuerpo quimérico 7C10, denominado igualmente C7C10 (sobrenadante del cultivo de células cos7 transfectadas).

Figura 17: Comparación de la secuencia de aminoácidos de 7C10 VL de ratón (SEC ID n° 54), con células de otros anticuerpos de ratón que tienen la homología más alta de secuencias.

La numeración de los aminoácidos, es la de Kabat *et al.* (1991). Los restos en las regiones de la estructura (CDR exteriores) que difieren entre 7C10 VL y el subgrupo II de ratón de Kabat (SEC ID n° 57), están subrayados. Un punto indica que el resto es idéntico en esta posición en comparación con la secuencia de 7C10 VL. DRB1-4.3 (SEC ID n° 55) representa la secuencia de la cadena ligera de una cadena B clase II del MHC de anticuerpo de ratón anti-

ES 2 283 759 T3

humano (el número de acceso en el banco de datos de Kabat es N011794). C94-5B11'CL (SEC ID nº 56) representa la secuencia de la cadena ligera de un anticuerpo de ratón (el número de acceso en el banco de datos de Kabat es P019314).

- 5 Figura 18: Comparación de las secuencias de aminoácidos de 7C10 VL de ratón (SEC ID nº 54), con células de las cadenas ligeras humanas que pertenecen al subgrupo II de humano de Kabat (SEC ID nº 60), y que tiene la homología más alta de secuencias.

10 Las secuencias de aminoácidos están alineadas y se comparan con las del 7C10 VL de ratón. Un punto indica que el resto es idéntico en esta posición en comparación con la secuencia de 7C10 VL. GM607 (SEC ID nº 58) representa la secuencia de la cadena ligera kappa segregada por la línea linfoblastoide GM607 humana (Klobeck *et al.*, Nucleic Acids Res., 12: 6995-7006, 1984a, y Klobeck *et al.*, Nature, 309: 73-76, 1984b; el número de acceso en el banco de datos de Kabat es N011606). DPK15/A19 (SEC ID nº 59) representa la secuencia de la línea germinal V kappa II humana.

15 Figura 19: Comparación de las secuencias de aminoácidos de regiones variables de las cadenas ligeras (VL) de 7C10 de ratón (SEC ID nº 54), del anticuerpo GM 607 humano (SEC ID nº 58), y de dos versiones de 7C10 1 y 2 humanizadas (SEC ID nº 61 y 65).

20 Las secuencias de aminoácidos están alineadas y se comparan con las de 7C10 VL de ratón. Un punto indica que el resto es idéntico en esta posición en comparación con la secuencia de 7C10 VL. GM607 representa la secuencia de la cadena ligera kappa segregada por la línea linfoblastoide GM607 humana (Klobeck *et al.*, 1984a y 1984b; el número de acceso en la base de datos de Kabat es N011606).

25 Figura 20: Secuencia de ADNc (SEC ID nº 62), su hebra complementaria (SEC ID nº 64) y su traducción en aminoácidos (SEC ID nº 63), del gen construido mediante ensamble *de novo* que codifica el péptido líder y la versión humanizada 1 de 7C10 VL.

30 Figura 21: Secuencia de ADNc (SEC ID nº 66), su hebra complementaria (SEC ID nº 68) y su traducción en aminoácidos (SEC ID nº 67), del gen construido mediante ensamble *de novo* que codifica el péptido líder y la versión humanizada 2 de 7C10 VL.

35 Figura 22: Comparación de las secuencias de aminoácidos de 7C10 VH de ratón (SEC ID nº 69) con las de las cadenas pesadas de ratón-humano que pertenecen al subgrupo I(A) de ratón de Kabat, y que tienen la homología más alta de secuencias.

40 La numeración de los aminoácidos es la de Kabat *et al.* (1991). Los restos en las regiones de la estructura (CDR exteriores) que difieren entre 7C10 VH y el subgrupo I(A) de ratón de Kabat (SEC ID nº 71), están subrayados. Un punto indica que el resto es idéntico en esta posición en comparación con la secuencia de 7C10 VH de ratón. ANO3'CL (SEC ID nº 70) representa la secuencia de la cadena pesada de un anticuerpo de ratón (el número de acceso en la base de datos de Kabat es P001289).

45 Figura 23: Comparación de las secuencias de aminoácidos de 7C10 VH de ratón (SEC ID nº 69) con las de las cadenas pesadas humanas que pertenecen al subgrupo II humano de Kabat (SEC ID nº 72), y que tiene la homología más alta de secuencias.

50 Los restos subrayados forman parte de las estructuras canónicas definidas por Chothia *et al.* (1989). Un punto indica que el resto es idéntico en esta posición en comparación con la secuencia de 7C10 VH de ratón. VH FUR1'CL humano (SEC ID nº 73) representa la secuencia de la cadena pesada de un anticuerpo anti-lamina B humano IgM/K de origen autoinmune (Mariette *et al.*, Arthritis and Rheumatism, 36: 1315-1324, 1993; número de acceso en Kabat: N020619). La línea germinal humana (SEC ID nº 74) representa la secuencia de la línea germinal humana 4.22 VH IV (Sanz *et al.*, EMBO. J. 8: 3741-3748, 1989).

55 Figura 24: Comparación de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesadas (VH) de 7C10 de ratón (SEC ID nº 69), y de las tres versiones humanizadas, mediante injerto de CDR, VH humanizada 1, 2 y 3 (respectivamente, SEC ID nº 75, 79 y 83).

60 La numeración de los restos corresponde a la de Kabat. Las secuencias están alineadas, y se comparan con las de 7C10 VH de ratón. Un punto indica que el resto es idéntico en esta posición en comparación con la secuencia de 7C10 VH de ratón.

65 Figura 25: Secuencia de ADNc (SEC ID nº 76), su hebra complementaria (SEC ID nº 78) y su traducción en aminoácidos (SEC ID nº 77), del gen construido mediante ensamble *de novo* que codifica el péptido líder y la versión humanizada 1 de 7C10 VH.

Figura 26: Secuencia de ADNc (SEC ID nº 80), su hebra complementaria (SEC ID No. 82) y su traducción en aminoácidos (SEC ID nº 81), del gen construido mediante ensamble *de novo* que codifica el péptido líder y la versión humanizada 2 de 7C10 VH.

ES 2 283 759 T3

Figura 27: Secuencia de ADNc (SEC ID nº 84), su hebra complementaria (SEC ID nº 86) y su traducción en aminoácidos (SEC ID nº 85), del gen construido mediante ensamble *de novo* que codifica el péptido líder y la versión humanizada 3 de 7C10 VH.

Figura 28: Comparación de la actividad de reconocimiento del receptor IGF-1 por el anticuerpo quimérico 7C10 (denominado “C7C10”) y su versión humanizada 1 (7C10 hum 1) en ELISA.

Figura 29: Influencia sobre la actividad de reconocimiento del receptor IGF-1 de las versiones humanizadas 1 y 2 de la cadena ligera del anticuerpo 7C10 en ELISA.

Figura 30: Comparación de la actividad de reconocimiento del receptor IGF-1 por el anticuerpo quimérico 7C10 y tres versiones humanizadas de la cadena pesada (7C10 hum 1, 2 y 3) en asociación con 7C10 VL 2 humanizado en ELISA.

Figura 31: Actividad antitumoral del anticuerpo 7C10 en un modelo ortotópico A549.

Figuras 32A, 32B, 32C y 32D: Estudio de la ADCC observada a nivel de células A549 y MCF-7 cultivadas durante 4 horas en presencia del anticuerpo 7H2HM (respectivamente, figuras 32C y 32D). El anticuerpo h4D5 se usa en paralelo como un control positivo del experimento para las células A549 y MCF-7 (respectivamente, figuras 32A y 32B).

Figuras 33A, 33B y 33C: Efecto de los anticuerpos 7C10 y 7H2HM sobre el ciclo celular de las células MCF-7.

La figura 33A representa la proporción de células MCF-7 en la fase G0/G1, S y G2/M en ausencia del IGF1, expresada como un porcentaje significativo del total de células MCF-7 observadas.

La figura 33B representa la proporción de células MCF-7 en la fase G0/G1, S y G2/M en presencia del IGF1, expresada como un porcentaje del total de células MCF-7 observadas.

La figura 33C representa la proporción de células MCF-7 en la fase S (■) y G2/M (□), expresada como un porcentaje del total de células MCF-7 observadas, en presencia de los compuestos indicados en la figura, en comparación con una muestra de control en ausencia del IGF1 (“0”).

Figuras 34A y 34B: Efecto comparativo de los anticuerpos 7C10 y 7H2HM sobre el crecimiento de células A549 *in vitro* (figura 34A) y sobre el crecimiento de células MCF-7 *in vivo* (figura 34B).

Figuras 35A y 35B: Estudio de la sinergia del anticuerpo 7H2HM asociado con navelbina (NA) sobre el modelo A549 *in vivo*, en comparación con las muestras de control. La figura 35A representa el desarrollo del volumen del tumor implantado en función del tratamiento llevado a cabo a partir del comienzo del tratamiento y durante aproximadamente 50 días (figura 35A). La Figura 35B representa, de manera particular, los resultados obtenidos para este desarrollo comparado en aproximadamente 48 días. En esta figura, los resultados obtenidos con el anticuerpo 7C10 se han introducido a título comparativo (los asteriscos (*)) corresponden al grupo de control de comparación/grupo (7C10 + Na) o grupo de control/grupo (7H2HM + Na) en un ensayo t).

Figura 36: Estudio del efecto de los anticuerpos 7C10 y 7H2HM sobre la apoptosis.

Esta figura representa la potenciación del efecto de la doxorubicina por los anticuerpos 7C10 y 7H2HM (doxorubicina, 2 µg/ml).

Figuras 37A a 37D: Demostración mediante un marcado de FACS, de la presencia del EGFR y del IGF-IR sobre la superficie de células A549.

Figura 38: Efecto de una coadministración de los ACM 7C10 y 225 sobre el crecimiento *in vivo* del tumor A549.

Figura 39: Efecto de una coadministración de los ACM 7C10 y 225 sobre la supervivencia de ratones implantados ortotópicamente con células A549.

Figuras 40A y 40B: Demostración de la inhibición de la fosforilación de tirosina de la cadena beta del IGF-IR y de IRS-1 por los ACM 7C10 y 7H2HM.

Figura 41: Demostración de la inducción de la incorporación del IGF-IR por los ACM 7C10 y 7H2HM.

Figuras 42A a 42C: Demostración de la degradación del IGF-IR por los ACM 7C10 y 7H2HM.

Ejemplo 1

Generación y selección del anticuerpo monoclonal (AcM) murino

5 A fin de generar AcM dirigidos específicamente contra el IGF-IR, y que no reconocen al IR, se concibió un protocolo que comprendía 6 etapas de detección sistemática:

El protocolo consistía en:

- 10 - inmunizar ratones con IGF-IR recombinante, para generar hibridomas,
- seleccionar los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA sobre la proteína recombinante que sirvió para la inmunización,
- 15 - ensayar todos los sobrenadantes de hibridomas positivos mediante ELISA sobre el receptor nativo sobre-expresado sobre la superficie de células tumorales MCF-7,
- evaluar los sobrenadantes de hibridomas positivos en las dos primeras detecciones sistémicas en términos de reconocimiento diferencial del IGF-IR y del IR sobre células de insecto infectadas con baculovirus que expresan respectivamente al IGF-IR o al IR,
- 20 - verificar que los anticuerpos seleccionados en esta etapa fueran capaces de inhibir *in vitro* la proliferación de las células MCF-7 inducida por el IGF1,
- 25 - garantizar la actividad *in vivo*, en ratones atómicos, del candidato retenido en términos de impacto sobre el crecimiento del tumor MCF-7.

El conjunto de estos diferentes resultados y de los resultados obtenidos se describirán brevemente a continuación en el ejemplo 1.

30 Para la etapa de inmunización, se inyectaron dos veces los ratones, mediante la vía subcutánea, con 8 μ g del IGF-IR recombinante. Tres días antes de la fusión de las células de la rata hembra con las células del mieloma murino Sp2OAg14, se estimularon los ratones mediante una inyección intravenosa de 3 μ g del receptor recombinante. Catorce días después de la fusión, los sobrenadantes de hibridomas se seleccionaron mediante ELISA, sobre placas sensibilizadas por el IGF-IR recombinante. Los hibridomas cuyos sobrenadantes se encontraron positivos, se conservaron y se amplificaron antes de ser ensayados sobre el FACScan a fin de verificar que los anticuerpos producidos fueran igualmente capaces de reconocer al IGF-IR nativo. Para eso, se incubaron células MCF-7 de un tumor de mama dependiente de estrógeno que sobreexpresa al IGF-IR, con cada uno de los sobrenadantes de cultivo producidos por los hibridomas seleccionados en ELISA. Los complejos del receptor nativo/AcM sobre la superficie de la célula, fueron revelados mediante un anticuerpo anti-especie secundario acoplado a un fluorocromo. Las figuras 3A a 3C muestran un histograma tipo obtenido con el sobrenadante del hibridoma 7C10 (figura 3C) comparado con un marcado de células solas + anticuerpo secundario (figura 3A), o con un marcado usando un isotipo de control (figura 3B).

45 En esta etapa de la selección, sólo los hibridomas que segregan AcM y que reconocen al mismo tiempo al receptor recombinante y el receptor nativo, fueron seleccionados y clonados. Los AcM segregados por estos hibridomas se obtuvieron y se purificaron antes de ser ensayados sobre el FACScan, según el método descrito anteriormente, sobre células de insectos Sf9 que expresan al IGF-IR o al IR, a fin de eliminar los hibridomas que reconocen al mismo tiempo a los dos receptores. La figura 4A muestra una recuperación total de los histogramas 1, 2, y 3 que corresponden, respectivamente, a las células no infectadas + anticuerpos secundarios (1), a las células no infectadas marcadas por α IR3 + anticuerpos secundarios (2), y a las células no infectadas marcadas por un anticuerpo anti-IR + anticuerpos secundarios (3). Este primer resultado muestra bien la ausencia del IGF-IR y del IR detectables sobre la superficie de estas células de insecto no infectadas. La figura 4B muestra un marcado de células infectadas mediante un baculovirus que expresa al IGF-IR. En esta segunda figura, el α IR3, usado como control positivo, marca bien, como era de esperar, a las células (valor máximo 2), mientras que el anti-IR (valor máximo 3) se superpone sobre el valor máximo de células individuales. Finalmente, en la figura 4C, se muestra que el anti-IR marca bien, como era de esperar, a las células Sf9 que expresan al IR (valor máximo 3), pero de manera inesperada, el α IR3, descrito en la bibliografía como específico para el IGF-IR, parece reconocer igualmente al IR (valor máximo 2).

60 Los resultados obtenidos en este tercer sistema de detección sistemática se resumen en la tabla 1, y muestran la generación de un AcM: el 7-C-10, satisfaciendo los criterios de reconocimiento del FIGF-BRT, y de falta de reconocimiento del IR. El isotipaje del AcM 7C10 mostró que se trataba de una IgG1.

65

TABLA 1

Reactividad comparativa del AcM 7C10 sobre células de insectos Sf9 que expresan al IGF-IR o al IR

	MFI (intensidad de fluorescencia media)		
	Células no infectadas	IGF1R + células	IR + células
Células	8	8	7
Anti-IR	4,6	9	91
Anti-IGF-IR (α IR3)	9	35	32
EC2	8	13	11
FITC anti-ratón	4,3	9	13
Medio de ultracultivo	9	10	11
15B9	7,5	25	77,8
9F5D	8	41	40
13G5	7,8	37	24
7C10	8,6	49	13

Las dos últimas detecciones sistemáticas provistas por la selección del AcM, consistieron en verificar que esta última fuera capaz de inhibir la proliferación celular inducida por el IGF-1 *in vitro* e *in vivo* sobre la línea celular MCF-7.

Para la selección *in vitro*, las células MCF-7 fueron inoculadas, privadas de suero de ternera fetal, y después incubadas en presencia de concentraciones crecientes de IGF-1 (de 1 a 50 ng/ml) en presencia o en ausencia del anticuerpo 7C10 a ensayar añadido de una concentración final de 10 μ g/ml. En este experimento, el AcM α IR3 comercial se introdujo como un control positivo, y el AcM 7G3 (aislado en paralelo al 7C10, y que reconoce débilmente al receptor nativo (MFI en el FACS de 50 en comparación con 200 para el AcM 7C10)) como un isotipo de control. La proliferación celular se calcula siguiendo en el contador β la incorporación de timidina tritiada por las células. Los resultados se expresan como un índice proliferativo. Los datos presentados en la figura 5 muestran que el IGF1 es capaz de estimular de manera dependiente de la dosis, la proliferación de las células MCF-7. El AcM α IR3, usado como un control positivo, inhibe completamente la proliferación de las células MCF-7 inducidas por el IGF-1. De la misma manera, el AcM 7C10 es capaz de inhibir significativamente el crecimiento de las células MCF-7 inducidas por el IGF-1. Finalmente, el AcM 7G3 usado como un isotipo de control resulta, como era de esperar, sin efecto alguno sobre el crecimiento celular tumoral *in vitro* en la célula MCF-7.

La selección *in vivo* se llevó a cabo en un modelo de tumor establecido. Para eso, ratones atímicos recibieron un implante subcutáneo de estrógeno de liberación lenta, indispensable para la absorción del tumor en un modelo murino. Veinticuatro horas después de la implantación de los estrógenos, se injertan subcutáneamente $5 \cdot 10^6$ células MCF-7 en el flanco derecho del ratón. Cinco días después de este injerto celular, los tumores se pueden medir, y se forman al azar lotes de 6 ratones. El tratamiento de los ratones se lleva a cabo dos veces por semana, durante 5 a 6 semanas, con una dosis de 250 μ g/dosis/ratón. En el grupo de control, los ratones se tratan de la misma manera con un isotipo de control murino. Los resultados presentados en la figura 6A muestran una inhibición muy significativa del crecimiento tumoral inducido por el anticuerpo 7C10. Esta actividad es particularmente inesperada si se hace referencia a los datos disponibles respecto al α IR3, usado siempre como una referencia en el dominio del receptor para el IGF1, y conocido por carecer de actividad *in vivo* sobre el crecimiento de tumores dependiente de estrógeno (véase la figura 6B). Además, en comparación con los resultados obtenidos con el anticuerpo recombinante scFv-Fc derivado del AcM 1H7 murino (véase la figura 6C), el AcM 7C10 es mucho más eficaz en la inhibición *in vivo* del crecimiento de las células MCF-7.

Ejemplo 2

Comparación del efecto de 7C10 y del tamoxifeno sobre el crecimiento *in vivo* del tumor MCF-7

Con el propósito de determinar la potencia del tratamiento mediante el anticuerpo 7C10 en el ámbito del cáncer de mama dependiente de estrógeno, se comparó el 7C10 con el compuesto tamoxifeno usado comúnmente para el tratamiento de carcinoma de mama en el ámbito de formas evolucionadas con progresión local y/o metastásicas, y en el ámbito de la prevención de recidivas (véase VIDAL 2000, páginas 1975-1976).

En cánceres de mama dependientes de hormonas, existe una correlación significativa entre la expresión de los receptores a los estrógenos (ER) y la del IGF-IR (Surmacz E. *et al.*, Breast Cancer Res. Treat., Feb., 47(3): 255-267,

1998). Por otra parte, parece ser que los estrógenos (E2) actúan en sinergia con el IGF1 (escrito a veces como IGF-I o IGFI), para estimular la proliferación celular. En efecto, se ha mostrado que un tratamiento con E2 incrementa de aproximadamente 10 veces el nivel del ARNm del IGF-IR, así como el nivel de expresión de la proteína (Lee A.V. *et al.*, Mol. Endocrinol., mayo, 13(5): 787-796, 1999). Este incremento se traduce por un aumento significativo de la fosforilación del IGF-IR. Además, los E2 estimulan significativamente la expresión del IRS-1 ("IRS-1" para "sustrato receptor de insulina-1"), que es uno de los sustratos del IGF-IR fosforilado.

El tamoxifeno se usa ampliamente desde hace muchos años en terapia hormonal para el tratamiento de pacientes que sufren de cánceres de mama dependientes de E2 (Forbes J. F., Semin. Oncol., Feb., 24 (1. Supl. 1): S1-5-S1-19, 1997). Esta molécula entra en competencia con el estradiol, e inhibe la unión de éste a su receptor (Jordan V.C., Breast Cancer Res. Treat., 31(1): 41-52, 1994). Además, se ha demostrado que el tamoxifeno es capaz de inhibir la proliferación dependiente del IGF-IR, inhibiendo la expresión del receptor y su fosforilación (Guvakova M. A. *et al.*, Cancer Res., 1 de julio, 57(13): 2606-2610, 1997). El conjunto de estos datos parecen indicar que el IGF-IR es un mediador importante de la proliferación inducida por la interacción E2/ER.

Siendo el uso de tamoxifeno a largo plazo asociado con un incremento significativo en el riesgo de cáncer endometrial (Fisher *et al.*, J. of National Cancer Institute, 86, 7: 527-537, 1994; VIDAL 2000, 1975-1976), y de recidiva colateral de cáncer de mama independiente de E2 (Li C. I. *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. 4 de julio, 93(13): 1008-1013, 2001). En este contexto, se efectuó una comparación del efecto antitumoral *in vivo* del anticuerpo 7C10 y del tamoxifeno en el modelo de MCF-7, a fin de determinar la parte de la actividad relacionada con el IGF-IR en la proliferación mediada por ER. Para eso, se implantaron 7.10^6 células MCF-7 en sc (subcutáneamente) en ratones atímicos, 24 horas después de la implantación, en estos mismos ratones, de un gránulo de estradiol con liberación prolongada (0,72 mg/tableta liberada durante 60 días), indispensable para el establecimiento de cualquier tumor humano dependiente de E2 en esta especie animal. Cinco días después de esta implantación, los tumores se miden, y se forman grupos de 6 ratones. Estos grupos se tratan respectivamente con 1) el anticuerpo 7C10 inyectado ip (intraperitonealmente) a razón de 250 μ g/ratón, dos veces por semana, 2) 10 μ g de tamoxifeno administrado en PBS que contiene 3% de hidroxipropilcelulosa (HPC) ip, o 3) el solvente en el cual el tamoxifeno se absorbe (hidroxipropilcelulosa). El tamoxifeno se administra diariamente durante 4 semanas, salvo el fin de semana. Los ratones tratados con el AcM 7C10 reciben igualmente, cada día, una inyección de 3% de PBS con HPC. Se llevó a cabo previamente un estudio para verificar que el solvente solo carece de efecto sobre el crecimiento tumoral.

Los resultados presentados en la figura 7 muestran que el AcM 7C10 es capaz de inhibir significativamente el crecimiento del tumor MCF-7 *in vivo* (los asteriscos (*) corresponden a la comparación del grupo de control/grupo de 7C10 en un ensayo t). De manera sorprendente, el anticuerpo 7C10 parece ser significativamente más eficaz que el tamoxifeno para la inhibición del crecimiento tumoral (los círculos °) corresponden a la comparación del grupo de tamoxifeno/grupo de 7C10 en un ensayo t), sugiriendo que este tipo de tratamiento mediante AcM podría sustituir al tratamiento con tamoxifeno.

Ejemplo 3

Demostración de la actividad antitumoral del AcM 7C10 in vivo sobre tumores humanos de diferentes orígenes

a) Actividad in vivo del anticuerpo 7C10 en tres modelos de tumor

A fin de generalizar la actividad del anticuerpo 7C10 hacia otros tumores que expresan al receptor para IGF1, se ensayó el 7C10 *in vivo* en un modelo de tumor de próstata DU145 independiente de andrógenos (escrito igualmente como DU-145), en un modelo de osteosarcoma SKES-1 y en un modelo de tumor pulmonar de células no pequeñas A549. El protocolo es comparable al descrito anteriormente para MCF-7, y los resultados presentados en las figuras 8A a 8C muestran una actividad significativa de este ACM en los tres modelos de tumor. La actividad observada en el modelo de tumor de próstata se observará muy particularmente en la medida en la que la cadena sencilla scFv del ACM 1H7 carece de actividad en un modelo de tumor de la próstata independiente de andrógenos (Li *et al.*, 2000).

b) Actividad in vivo del anticuerpo 7C10 en un modelo ortotópico de A549

Los modelos de xenoinjerto convencionales descritos anteriormente no permiten el estudio de profármacos sobre la diseminación metastásica. En efecto, los tumores implantados s.c. (subcutáneamente) siguen siendo localizados al sitio de inyección, y no son, por lo tanto, realmente una reflexión de la situación en el ser humano. A fin de evaluar el anticuerpo en cuestión en un modelo más cercano a la realidad, se implantaron las células A549 en un sitio intrapleurar. Este modelo, el cual está bien descrito (Clin. Cancer. Res. Enero de 2000; 6(1): 297-304), permite observar una diseminación metastásica cercana a la observada en el ser humano, con metástasis mediastinales, pulmonares, cardíacas y vertebrales. En el estudio que se llevó a cabo, se inyectaron de forma intrapleurar 10^6 células A549 en ratones atímicos hembras. Siete días después de la implantación, se dividió a los ratones en dos lotes de 22. Uno de estos lotes recibió una dosis de desafío de 500 μ g/ratón, y se trató después dos veces por semana a razón de 250 μ g de 7C10/dosis. El segundo lote se trató según el mismo esquema con el isotipo de control 9G4. La figura 31 muestra una extensión de supervivencia significativa en los ratones tratados con el ACM 7C10, indicando que este anticuerpo es capaz de tener una acción sobre la diseminación metastásica.

Ejemplo 4

Comparación del AcM 7C10 con navelbina in vivo; efecto de una coadministración de los dos tratamientos

La navelbina es un compuesto de quimioterapia indicado en cáncer pulmonar de células no pequeñas y en cáncer de mama metastásico. Se hizo un estudio comparativo de 7C10 y de navelbina de la sinergia eventual entre los dos productos sobre el modelo tumoral A549. Para este estudio, se insertaron subcutáneamente 5.10^6 células A549 en el flanco derecho del ratón. Cinco días después del injerto celular, se pueden medir los tumores, y se inician los tratamientos con AcM y/o navelbina. La dosis de AcM es siempre de $250 \mu\text{g}/\text{dosis}/\text{ratón}$, dos veces por semana, intraperitonealmente. Respecto a la navelbina, se administrará a la dosis máxima tolerada por el ratón o sea $10 \text{ mg}/\text{kg}$, intraperitonealmente. Para este tratamiento, se aplicarán tres inyecciones a intervalos de 7 días. Durante las coadministraciones, se mezclan los dos productos antes de la inyección.

Los resultados presentados en la figura 9 muestran de manera sorprendente que, en este modelo, el anticuerpo 7C10 es tan activo como el tratamiento convencional con navelbina. Una sinergia muy significativa de los dos productos se observa igualmente con cinco de siete ratones que no tienen tumores medibles en el día 72.

Ejemplo 5

Estudio de la inhibición in vitro del crecimiento de los tumores MCF-7 inducido por el IGF2

Como se indicó anteriormente, el IGF-IR es sobreexpresado por numerosos tumores, pero se ha descrito además que en una buena parte de los cánceres de mama y de colon especialmente, la señal de proliferación se da para este receptor vía el IGF2 (escrito a veces como IGF-II o IGFII). Por lo tanto, es esencial asegurarse de que el AcM 7C10 sea capaz igualmente de inhibir el crecimiento del tumor MCF-7 *in vitro* inducido por el IGF2. Para eso, se inocularon células en placas de 96 pocillos, en ausencia privados de suero de ternera fetal, y se estimularon mediante la adición de 200 ng de IGF2 por ml final de medio, en presencia y en ausencia de AcM a ensayar introducidos con una concentración de $10 \mu\text{g}/\text{ml}$. Los resultados presentados en la figura 10 muestran que el IGF2, al igual que el IGF1, estimula significativamente el crecimiento de células MCF-7. La adición de un isotipo de control, el 9G4, continúa careciendo de efecto sobre esta estimulación. Como se describe por De Léon *et al.* (Growth Factors, 6: 327-334, 1992), no se observa efecto alguno durante la adición del AcM αIR3 . En cambio, el 7C10 inhibe totalmente el crecimiento inducido por el IGF2. Su actividad es significativamente mejor que la de 1H7.

Ejemplo 6

*Actividad biológica de los anticuerpos 7C10 quiméricos (C7C10) y 7C10 humanizados (h7C10)**a) Comparación de 7C10/C7C10 y 7C10/h7C10 en el modelo de MCF-7 in vitro*

Se ensayaron *in vitro* la forma quimérica del AcM 7C10 y la forma humanizada 1 purificada (escrita aquí como 7H2HM) en el modelo de MCF-7 tal como se describió anteriormente. Los resultados presentados respectivamente en las figuras 11 y 12, muestran que estas dos formas tienen perfectamente preservadas sus propiedades para inhibir el crecimiento del tumor MCF-7 inducido por el IGF1.

b) Efecto comparativo de los AcM 7C10 y h7C10 sobre la transducción de la señal inducida por la unión del IGF1 a su receptor

La actividad de la inhibición del crecimiento inducido *in vitro* por el IGF1 sobre la línea MCF-7 debería de ser la traducción de una inhibición de la transducción de la señal mediada por el IGF1 durante la unión del AcM 7C10 al receptor. A fin de verificar esta hipótesis, se incubaron células MCF-7 con o sin IGF1, en presencia o en ausencia de los anticuerpos que se van a ensayar. Después de un tiempo de incubación breve, las células se lisaron, la cadena β se inmunoprecipitó, y se calculó la fosforilación de esta subunidad con la ayuda de un anticuerpo antifosfotirosina quinasas. Los resultados presentados en la figura 13 muestran que la unión del 7C10 o del h7C10 inhibe significativamente la fosforilación de la subunidad β del IGF-IR, al opuesto de un anticuerpo irrelevante murino (9G4) o humano (escrito como IgG1 en el esquema).

c) Implicación del anticuerpo 7H2HM en los mecanismos de ADCC

La inhibición de la transducción de la señal descrita anteriormente en el párrafo b), es el mecanismo de acción principal implicado en la actividad biológica de los anticuerpos 7C10 y 7H2HM. Sin embargo, es probable que durante su administración en el ser humano, el anticuerpo 7H2HM, de isotipo IgG1, sea capaz de inducir una lisis celular mediante un mecanismo de tipo ADCC (citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo). A fin de verificar este punto, se ponen células NK (células asesinas naturales) que provienen de la sangre periférica de donantes humanos en presencia de células A549 o MCF-7 incubadas previamente durante 4 horas con $10 \mu\text{g}$ de anticuerpo 7H2HM por

5.10⁵ células y marcadas con ⁵¹Cr (50 µg). En este experimento, se usa la herceptina (escrita como h4D5 en las figuras 32A y 32B), como un control positivo del experimento. Las figuras 32A a 32D muestran que, como era de esperar, la herceptina induce una ADCC significativa sobre las dos células A549 y MCF-7 (véase, respectivamente, las figuras 32A y 32B). El 7H2HM es igualmente capaz de inducir una ADCC sobre las células A549 (véase 32C), pero este fenómeno es de amplitud menor sobre las células MCF-7 (véase la figura 32D).

d) *Efecto de los anticuerpos 7C10 y 7H2HM sobre el ciclo celular*

La inhibición del crecimiento celular observado *in vitro* sobre la línea MCF-7, debería de traducirse mediante un efecto sobre el ciclo celular. A fin de responder a esta cuestión, se inoculan 4.10⁵ células en placas de 6 pocillos. Veinticuatro horas después de la inoculación, se quita el suero de ternera, y se añade IGF1 en presencia o en ausencia de los anticuerpos que se van a ensayar. Después de incubar durante 24 horas, las células se recuperan para el estudio del ciclo celular. La figura 33B muestra el efecto del IGF1 sobre la entrada en el ciclo y en el crecimiento de las células MCF-7, en comparación con la entrada en el ciclo y en el crecimiento de las células MCF-7 en ausencia del IGF1 (véase la figura 33A). Después de la adición del factor de crecimiento, se observa una disminución significativa en la fase G0/G1 (de 88,2% a 56,3%) para el beneficio de las fases S (de 7,8% a 31%) y G2/M (de 4% a 12,7%). Durante la adición de los anticuerpos 7C10 y 7H2HM (véase la figura 33C), se observa una inhibición significativa de la entrada en el ciclo. Se observará que el anticuerpo murino y su homólogo humanizado tienen una actividad comparable sobre el ciclo celular. El α IR3, introducido como control positivo parece ser ligeramente menos activo que el 7C10 y 7H2HM en este ensayo. El anticuerpo 9G4 usado como isotipo de control, carece de efecto sobre el ciclo celular.

e) *Actividad comparada in vivo de los anticuerpos 7C10 y 7H2HM sobre el modelo A549*

A fin de confirmar la actividad del anticuerpo humanizado 7H2HM *in vivo*, este último se comparó al 7C10 en el modelo de tumor pulmonar de células no pequeñas A549. Este ensayo se llevó a cabo exactamente como se describió anteriormente, salvo por la dosis de anticuerpo que es de 125 µg/dosis dos veces por semana en lugar de 250 µg/dosis dos veces por semana, eso por la falta de disponibilidad de mayores cantidades de 7H2HM. El anticuerpo 9G4 se usó como isotipo de control para 7C10, y una inmunoglobulina humana irrelevante de isotipo IgG1 (denominada más adelante como HIgG1) se usó como control para el anticuerpo humanizado 7H2HM.

La figura 34A muestra que no existen diferencias significativas entre las curvas de control de 9G4 y HIgG1. Como era de esperar, se observa una inhibición significativa del crecimiento del tumor con el anticuerpo murino 7C10. Respecto al anticuerpo humanizado 7H2HM, la actividad observada es de exactamente la misma intensidad que la observada con su contraparte murino. Este dato, añadido a las observaciones descritas anteriormente *in vitro*, indica que la humanización no modificó las propiedades del anticuerpo generado. Por otra parte, en los modelos de xenoinjerto en el ratón, la actividad del anticuerpo humanizado parece estar relacionada integralmente con un mecanismo de inhibición de la transducción de la señal. En efecto si una parte de ADCC estaba en juego en el crecimiento tumoral en el ratón atómico, tendría que observarse una diferencia entre la actividad de los anticuerpos murinos y humanizados.

Asimismo, se llevó a cabo un experimento *in vivo* sobre el modelo de tumor de mama MCF-7 y muestra que, como era de esperar, el anticuerpo 7H2HM es perfectamente comparable con el anticuerpo murino 7C10 para la inhibición del crecimiento de este tumor *in vivo* (figura 34B).

f) *Demostración de una sinergia entre 7H2HM y navelbina*

El protocolo descrito en el ejemplo 4 se repitió con el propósito de reproducir los resultados obtenidos con 7C10 con su homólogo humanizado: el anticuerpo 7H2HM.

Los resultados presentados en las figuras 35A y 35B muestran que, tal como en el caso de 7C10, se demuestra una sinergia significativa entre el anticuerpo humanizado 7H2HM y navelbina.

g) *Efecto de los anticuerpos 7C10 y 7H2HM sobre la apoptosis de células MCF-7 in vitro*

Como se indicó anteriormente, el IGF-IR es capaz de conferir una protección contra la apoptosis cuando se sobreexpresa sobre la superficie de las células. Por otra parte, se ha demostrado, en estos ejemplos, que los anticuerpos 7C10 y 7H2HM fueron capaces de potenciar un compuesto activo en quimioterapia. A fin de ensayar la potencia de los anticuerpos 7C10 y 7H2HM para inducir la apoptosis, y para explicar en parte su potencial de sinergia con la quimioterapia, se realizaron experimentos en las células MCF-7 en presencia o en ausencia de doxorubicina, un medicamento conocido por inducir la apoptosis de esta línea celular *in vitro*. En estos experimentos, las células MCF-7 se inoculan a 2.10⁴/cm² en cajas de Petri, y se cultivan durante 24 horas en RPMI sin rojo de fenol, complementado con 10% de suero de ternera fetal (SVF). Después, las células se lavan 2 veces con PBS, y se ponen de nuevo en cultivo en un medio con 0% de FCS. Se les permite un tiempo de adaptación de 10 minutos a 37°C antes de la adición de los anticuerpos a 10 µg/ml. Después de otros 10 minutos a 37°C, se añade al medio de cultivo IGF-I recombinante

ES 2 283 759 T3

(Sigma), hasta una concentración final de 50 ng/ml. Las células se dejan de nuevo a 37°C durante 1 hora, para permitir la unión de los anticuerpos y del IGF-I. Finalmente, se añade la doxorubicina (Sigma) al medio de cultivo a 2 µg/ml, y las células se incuban durante 24 horas a 37°C.

Los experimentos se llevaron a cabo igualmente con navelbina a una concentración de 10 µg/ml.

El análisis de la viabilidad celular se realiza mediante análisis de citometría de flujo después de marcar con la anexina V-FITC (20 minutos, 4°C) y DAPI (2 µg/ml). El porcentaje de células muertas consideradas, es la población marcada con anexina +/DAPI +. Se usa el anticuerpo 5C2 como isotipo de control.

Los resultados representados en la figura 36, muestran que la doxorubicina induce una apoptosis en 8% de las células MCF-7. Cuando las células se tratan conjuntamente con el anticuerpo 7C10 y la doxorubicina se observa un incremento significativo en la muerte celular. Se muestra el mismo efecto con el anticuerpo 7H2HM. El mismo tipo de resultados se observó cuando el anticuerpo se asocia con navelbina.

Ejemplo 7

Estrategia de clonación de genes que codifican las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo monoclonal (AcM) 7C10

Se extrajo el ARN total de 10⁷ células de hibridomas que segregan el anticuerpo 7C10 usando el TRI REAGENT™ (según las instrucciones dadas por el proveedor, SIGMA, T9424). Se sintetizó la primera hebra de ADNc usando el kit de "síntesis de la primera hebra de ADNc" de Amersham-Pharmacia (#27-9621-01, según las instrucciones dadas por el proveedor).

Para las dos cadenas, la reacción fue cebada con el oligonucleótido Not I-d(T)18, incluido en el equipo.

El híbrido de ADNc: ARNm obtenido de esta manera, se usó para la amplificación, mediante PCR, de los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del AcM 7C10. Los PCR se llevaron a cabo usando una combinación de oligonucleótidos específicos para las cadenas pesadas y ligeras (kappa) de inmunoglobulinas de ratón. Los cebadores que corresponden a los extremos 5' se hibridan en la región que corresponde a los péptidos de señal (Tabla 2 para cadenas pesadas, Tabla 3 para cadenas ligeras). Estos iniciadores se compilaron a partir de un gran número de secuencias de anticuerpos de ratón encontradas en los bancos de datos (Jones S. T. *et al.*, Bio/Technology 9: 88-89, 1991). Los cebadores que corresponden a los extremos 3' se hibridan en las regiones constantes de las cadenas pesadas (dominio CH1 de la subclase de IgG1, no lejos de la unión V-C, cebador MHC-1, Tabla 4) y cadenas ligeras (dominio kappa no lejos de la unión V-C, cebador MKC, Tabla 4).

TABLA 2

Cebadores oligonucleotídicos para la región 5' de los dominios variables de las cadenas pesadas de inmunoglobulina de ratón (MHV) ("MHV" para "variable pesada de ratón")

MHV-1:	5' ATGAAATGCAGCTGGGTCATSTTCTT 3'	(SEC ID nº13)
MHV-2:	5' ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT 3'	(SEC ID nº14)
MHV-3:	5' ATGAAGWTGTGGTTAACTGGGTTTT 3'	(SEC ID nº15)
MHV-4:	5' ATGRAC TTTGGGYTCAGCTTGRT 3'	(SEC ID nº 16)
UHV-5:	5' ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTT 3'	(SEC ID nº 17)
MHV-6:	5' ATGGCTGTCTYTRGSGCTRCTCTTCTG 3'	(SEC ID nº 18)
MHV-7:	5' ATGGRATGGAGCKGGRTCTTTMTCTT 3'	(SEC ID nº 19)
MHV-8:	5' ATGAGAGTGCTGATTCTTTTG TG 3'	(SEC ID nº 20)
MHV-9:	5'ATGGM TTTGGGTGTGGAMCTTGCTATT-3'	(SEC ID nº 21)
MHV-10:	5' ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCCT 3'	(SEC ID nº 22)
MHV-11:	5' ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG 3'	(SEC ID nº 23)
MHV-12:	5' ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCT 3'	(SEC ID nº 24)
NB KEY:	R=A/G, Y=T/C, W=A/T, K=T/G, M=A/C, S=C/G.	

ES 2 283 759 T3

TABLA 3

Cebadores oligonucleotídicos para la región 5' de los dominios variables de las cadenas kappa (ligeras) de inmunoglobulina de ratón (MKV) ("MKV" para "variable kappa de ratón")

5	MKV-1:	5' ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT 3'	(SEC ID nº 25)
	MKV-2:	5' ATGGAGWCAGACACACTCCTGYTATGGGT 3'	(SEC ID nº 26)
	MKV-3:	5' ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCT 3'	(SEC ID nº 27)
10	MKV-4:	5' ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGG 3'	(SEC ID nº 28)
	MKV-5:	5' ATGGATTTWCAGGTGCAGATTWTCAGCTT 3'	(SEC ID nº 29)
	MKV-5A:	5' ATGGATTTWCARGTGCAGATTWTCAGCTT 3'	(SEC ID nº 30)
	MKV-6:	5' ATGAGGTKCYTGYTSAGYTYCTGRG 3'	(SEC ID nº 31)
15	MKV-7:	5' ATGGGCWTCAGATGGAGTCACA 3'	(SEC ID nº 32)
	MKV-8:	5' ATGTGGGOAYCTKTTYCMMTTTTTCAAT 3'	(SEC ID nº 33)
	MKV-9:	5' ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTT 3'	(SEC ID nº 34)
	MKV-10:	5' ATGTATATATGTTTGTGTCTATTTT 3'	(SEC ID nº 35)
20	MKV-11:	5' ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTT 3'	(SEC ID nº 36)
	MKV-12A:	5' ATGRAGTYWCAGACCCAGGTCTTYRT 3'	(SEC ID nº 37)
	MKV-12B:	5' ATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGT 3'	(SEC ID nº 38)
	MKV-13:	5' ATGGATTCACAGGCCAGGTTCTTAT 3'	(SEC ID nº 39)
25	NB KEY:	R=A/G, Y=T/C, W=A/T, K=T/G, M=A/C, S=C/G.	

TABLA 4

Cebadores oligonucleotídicos para los extremos 3' de los genes de V_H y V_L de ratón

30

Cadena ligera (MKC):
5' ACTGGATGGTGGGAAGATGG 3' (SEC ID nº 40)
Región constante del dominio Kappa de ratón:

35

A D A A P T V S I F P P S S (SEQ ID No. 41)
GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC ATC TTC CCA CCA TCC AGT (SEQ ID No. 42)
|| ||| ||| ||| ||| ||| |||
(MKC) CC ATC TTC CCA CCA TCC AGT (SEQ ID No. 43)

40

Cadena pesada (MHC-1)
5' CCAGTGGATAGACAGATG 3' (SEC ID nº 44)
Dominio CH1 de gama-1 de ratón (subclase IgG1):

45

A K T T P P S V Y P L (SEQ ID No. 46)
GCC AAA ACG ACA CCC CCA TCT GTC TAT CCA CTG (SEQ ID No. 45)
||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
(MHC-1) CCC CCA TCT GTC TAT CCA CTG (SEQ ID No. 47)

50

Ejemplo 8

Secuencias de inmunoglobulinas clonadas a partir del hibridoma de ratón 7C10

55 Siguiendo la estrategia de amplificación descrita anteriormente, se clonaron productos de PCR que corresponden a las regiones variables de las cadenas pesada (VH) y ligera (VL), usando los "sistemas de vector pGME®-T Easy" (Promega). Para 7C10 VL, se obtuvieron productos de PCR con el cebador MKC en combinación con los cebadores MKV1 y MKV2. Para 7C10 VH, se obtuvieron productos de PCR con el cebador MHC-1 en asociación con los
60 cebadores MHV8 y MHV12. Una secuenciación completa de los productos de PCR clonados en los vectores pGem-T easy, reveló dos secuencias diferentes para la cadena ligera, y una secuencia única para la cadena pesada.

a) Región variable aislada a partir del oligonucleótido MKV1

65 La secuencia de ADN obtenida es característica de una región variable de Ig funcional. Se presume por lo tanto que esta nueva secuencia es la que codifica 7C10 VL. Las secuencias de ADN (SEC ID nº 48 y 50) y de aminoácidos (SEC ID nº 49) del ADNc que codifica 7C10 VL, se representan en la figura 14.

b) *Región variable aislada del oligonucleótido MKV2*

El gen que codifica esta cadena ligera proviene de un transcrito de ARNm aberrante que está presente en todos los miembros de fusión estándares derivados del tumor MOPC-21 original del cual forma parte el mieloma de ratón Sp2/Oag14, el cual se usó para producir el hibridoma 7C10. Esta secuencia contiene una recombinación aberrante entre los genes V y J (supresión de cuatro bases nucleotídicas que conlleva a un cambio en el marco de lectura) y una mutación de la cisteína invariable en la posición 23 a tirosina. Estos cambios sugieren que esta cadena ligera sería no funcional, aunque, sin embargo, transcrita a ARNm. No se muestra la secuencia de ADN de esta pseudocadena ligera.

c) *Región variable aislada de los oligonucleótidos MHV8 y MHV12*

Las secuencias de ADN obtenidas con estos dos oligonucleótidos son idénticas, salvo la secuencia codificada por el oligonucleótido mismo. Esta secuencia es una nueva secuencia que codifica una cadena pesada funcional que se presume es la del anticuerpo monoclonal 7C10. Las secuencias de ADN (SEC ID n° 51 y 53) y de aminoácidos (SEC ID n° 52) del ADNc que codifica 7C10 VH, se representan en la figura 15.

Ejemplo 9

Construcción de genes quiméricos de ratón-ser humano

Se construyó el anticuerpo quimérico 7C10 de manera a obtener las regiones VL y VH de 7C10 de ratón unidas a las regiones constantes kappa y gamma-1 de humano, respectivamente. Se usaron oligonucleótidos para modificar los extremos 5' y 3' de las secuencias que flanquean al ADN que codifica 7C10 VL y VH, a fin de permitir su clonación en vectores para expresión en células de mamífero. Estos vectores usan el promotor fuerte HCMV para transcribir efectivamente las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo quimérico 7C10. Por otra parte, estos vectores contienen igualmente el origen de replicación de SV40, que permite una replicación eficaz del ADN y, como consecuencia, una expresión transitoria de las proteínas en células cos.

Ejemplo 10

Expresión y evaluación de la actividad de reconocimiento del receptor IGF-1 del anticuerpo quimérico 7C10

Los dos plásmidos que contienen al ADN que codifica el anticuerpo 7C10 quimérico fueron cotransfectados en células cos-7 (número de ATCC CRL-1651), para estudiar la expresión transitoria del anticuerpo recombinante. Después de incubar durante 72 horas, el medio de cultivo se recogió, se centrifugó para eliminar los restos celulares, y se analizó mediante la técnica de ELISA para la producción de IgG1 de humano (véase el ejemplo 16) y el reconocimiento del receptor para el IGF-1 (véase el ejemplo 17).

Los ensayos de ELISA para medir las concentraciones de IgG1/kappa de humano, mostraron que la expresión del anticuerpo quimérico 7C10 en las células cos7, estaba comprendida entre 300 y 500 ng/mm, lo que es comparable con los valores obtenidos con la mayoría de los anticuerpos.

Los ensayos de ELISA para el reconocimiento del receptor para IGF-1 muestran que el anticuerpo quimérico lo reconoce específicamente, y con una buena avidéz relativa (véase las figuras 3A, 3B y 3C). Esto demuestra funcionalmente de que se ha identificado la buena VH y VL del anticuerpo 7C10. Además, esta forma quimérica de 7C10 parece ser una herramienta indispensable en la evaluación de la afinidad de las formas humanizadas.

Ejemplo 11

Elaboración de modelos moleculares de las regiones variables del anticuerpo 7C10 de ratón

A fin de facilitar y refinar el procedimiento de humanización mediante "injerto de CDR", se construyó un modelo molecular de las regiones VL y VH del anticuerpo 7C10 de ratón. Este modelo se basa en la estructura cristalográfica de la cadena pesada 1AY1 y de la cadena ligera 2 PCP.

Ejemplo 12

Procedimiento de humanización, mediante injerto de CDR, de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 7C10 (7C10 VL)

a) *Comparación de la secuencia de aminoácidos de 7C10 VL con todas las secuencias de VL conocidas de ratón*

Como etapa preliminar a la humanización mediante injerto de CDR, se comparó primero la secuencia de aminoácidos de 7010 VL con todas las secuencias de VL de ratón presentes en el banco de datos de Kabat (dirección Internet ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/database/kabat/fasta_format/, la última actualización de datos data de 1999). De esta manera, se ha identificado que 7C10 VL pertenece al subgrupo II de las cadenas ligeras kappa, como se define por Kabat *et al.* (en *Sequences of proteins of immunological interest* (5ª ed.), publicación de los NIH No. 91-3242, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, 1991). Se han identi-

ficado las regiones de VL de los anticuerpos monoclonales de ratón que tienen una identidad de secuencias que varía hasta 95% (DRB1-4.3 (SEC ID nº 55): 95%, y C94-5B11'CL (SEC ID nº 56): 95%, véase la figura 17). Para intentar identificar los restos ordinarios en la secuencia de 7C10 VL, se alineó la secuencia de aminoácidos de 7C10 VL (SEC ID nº 54) con la secuencia consenso del subgrupo II de las cadenas kappa de ratón (SEC ID nº 57), tal como se define por Kabat (véase la figura 17).

En la posición número 3 de Kabat, la valina (V) presente normalmente en el subgrupo II de las cadenas ligeras kappa según Kabat (71%), se sustituye por una leucina (L). Una leucina en esta posición no es raro, puesto que se encuentra, por ejemplo, en DRB1-4.3 y C94-5B11'CL. Según el modelo molecular, este resto no parece desempeñar una función particular. En consecuencia, no se contemplará la conservación de este resto en la forma humanizada.

En la posición número 7 de Kabat, la treonina (T) presente normalmente en el subgrupo II de las cadenas ligeras kappa según Kabat (66%), se sustituye por una isoleucina (I). Una isoleucina en esta posición es relativamente raro, puesto que sólo se encuentra 15 veces entre todas las secuencias de VL de ratón conocidas, y nunca entre las secuencias de VL de humano. El modelo molecular muestra que este resto (17) señala hacia la superficie de la molécula, pero no entra en contacto con las CDR (resto de una CDR más cercano sería la arginina en la posición número 42 de Kabat). Además, no parece muy probable que este resto 17 entre en contacto directamente con el antígeno. En consecuencia, no se contemplará la conservación de este resto en la forma humanizada, por lo menos al principio.

En la posición número 77 de Kabat, la arginina (R) presente normalmente en el subgrupo II de las cadenas ligeras kappa según Kabat (95,5%), se sustituye por una serina (S). Una serina en esta posición, no es raro.

b) Comparación de la secuencia de aminoácidos de 7C10 VL con todas las secuencias de VL de humano conocidas

A fin de identificar el mejor candidato de humano para el “injerto de CDR”, se buscó la región de VL kappa de origen humano que tuviera la mayor homología posible con 7C10 VL. Para este fin, se comparó la secuencia de aminoácidos de 7C10 VL kappa de ratón con todas las secuencias de VL kappa de humano presentes en la base de datos de Kabat. El 7C10 VL de ratón tuvo la mayor homología de secuencias con las regiones de VL kappa de humano del subgrupo II, tal como se define por Kabat *et al.* (1991). Se identificaron regiones de VH de anticuerpos monoclonales de origen humano que tienen una identidad de secuencias que varía hasta 75,9% (GM607 (SEC ID nº 58), véase la figura 18), sobre el total de los 112 aminoácidos que forman la región variable. Se identificó también una línea germinal de origen humano, DPK15/A19 (SEC ID nº 59), que tiene una identidad de secuencias de 76% (véase la figura 18), GM607 (Klobeck *et al.*, 1984). Por lo tanto, se seleccionó a GM607 como una secuencia de humano receptora de CDR (según la definición de Rabat) de 7C10 VL de ratón. Comparando las secuencias de GM607 con las de la secuencia consenso del subgrupo II de humano (SEC ID nº 60) (figura 18), no se pudo identificar ningún resto particular en las regiones de estructura (Rch), indicando así que GM607 era un buen candidato para injertos de CDR.

c) Versiones humanizadas de 7C10 VL

La siguiente etapa en el procedimiento de humanización, consistió en unir las CDR de 7C10 VL de ratón a las regiones de estructura (Rch) de la cadena ligera de humano seleccionada, GM607 (Klobeck *et al.*, 1984). En esta etapa del procedimiento, el modelo molecular de las regiones Fv de 7C10 de ratón es particularmente útil en la elección de los restos de ratón que serán conservados por ser capaces de desempeñar una función en el mantenimiento de la estructura tridimensional de la molécula (estructura canónica de las CDR, interfaz VH/VL, etc.), o en la unión al antígeno. En las Rch, se examinó escrupulosamente cada diferencia entre los aminoácidos de ratón (7C10 VL) y de humano (GM607) (véase la Tabla 5). Además, los restos particulares en la secuencia de 7C10 VL de ratón que se identificaron (véase el Ejemplo 12.a) se tomaron en cuenta, si era necesario.

En la primera versión humanizada mediante “injerto de CDR” de 7C10 VL, humana 1, se realizó un solo cambio en las regiones de estructura (Rch) de GM607. Este cambio se refiere al resto 2 (nomenclatura de Kabat) situado en la Rch 1. Este resto entra en efecto en la composición de la estructura canónica de la CDR 1 de 7C10 VL, y por lo tanto, podría ser crítico para mantener esta asa en su conformación adecuada. La valina presente en esta posición en la secuencia de 7C10 VL de ratón se conserva por lo tanto en esta misma posición en la forma humanizada (véase la Tabla 5 y la Figura 19 para la secuencia de aminoácidos (SEC ID nº 61), y la figura 20 para la secuencia de ADN (SEC ID nº 62 y 64) y la secuencia de aminoácidos que comprende el péptido de señal (SEC ID nº 63)).

En la segunda versión humanizada mediante “injerto de CDR” de 7C10 VL, humana 2, no se ha hecho ningún cambio en las Rch de la cadena ligera GM607 de humano. Todos los restos de las Rch son, por lo tanto, de origen humano, incluyendo el resto 2 que ha sido mutado, por lo tanto, para sustituir la valina presente en 7C10 VL de ratón por una isoleucina encontrada en esta misma posición en la cadena ligera GM607 de humano (véase la Tabla 5 y la figura 19 para secuencia de aminoácidos (SEC ID nº 65), y la figura 21 para la secuencia de ADN (SEC ID nº 66 y 68) y la secuencia de aminoácidos que comprende el péptido de señal (SEC ID nº 67)). Esta forma 2 de humano está, por lo tanto, totalmente humanizada (aparte, por supuesto, de las CDR en sí), puesto que todos los restos de las Rch son los de la cadena ligera de origen humano, GM607.

ES 2 283 759 T3

TABLA 5

Alineación de las secuencias de aminoácidos que llevan al diseño de las regiones de 7C10 V_L de humano remodeladas

Kabat	#	FR o CDR	Cadena ligera de ratón 7C10	Línea germinal de humano DPK15/A19	GM 607	7C10 1 de humano remodelada	7C10 2 de humano remodelada	Comentarios
1	1	FR1	D	D	D	D	D	
2	2	I	V*	I*	I*	V*	I*	L1 4(16) canónica Zona de Vernier
3	3	I	L	V	V	V	V	
4	4	I	M	M	M	M	M	Zona de Vernier
5	5	I	T	T	T	T	T	
6	6	I	Q	Q	Q	Q	Q	
7	7	I	I		S	S	S	
8	8	I	P	P	P	P	P	
9	9	I	L	L	L	L	L	
10	10	I	S	S	S	S	S	
11	11	I	L	L	L	L	L	
12	12	I	P	P	P	P	P	
13	13	I	V	V	V	V	V	
14	14	I	S	T	T	T	T	
15	15	I	L	P	P	P	P	
16	16	I	G	G	G	G	G	
17	17	I	D	E	E	E	E	
18	18	I	Q	P	P	P	P	
19	19	I	A	A	A	A	A	
20	20	I	S	S	S	S	S	
21	21	I	I	I	I	I	I	
22	22	I	S	S	S	S	S	
23	23	FR1	C	C	C	C	C	
24	24	CDR1	R	R	R	R	R	
25	25		S*	S*	S*	S*	S*	L14(16) canónica
26	26	I	S	S	S	S	S	
27	27	I	Q	Q	Q	Q	Q	
27A	28	I	S	S	S	S	S	
27B	29	I	I*	L*	L*	I*	I*	L14(16) canónica
27C	30	I	V	L	L	I	I	
27D	31	I	H	H	H	H	H	
27E	32	I	S	S	S	S	S	
28	33	I	N	N	N	N	N	
29	34	I	G	G	G	G	G	
30	35	I	N	Y	Y	n	N	
31	36	I	T	N	N	t	T	
32	37	I	Y	Y	Y	Y	Y	
33	38	I	L*	L*	L*	L*	L*	L1 4(16) canónica
34	39	CDR1	Q	D	D	q	Q	
35	40	FR2	W	W	W	W	W	Zona de Vernier
36	41	I	Y	Y	Y	Y	Y	Interfaz VH/VL Zona de Vernier
37	42	I	L	L	L	L	L	

ES 2 283 759 T3

38	43	I	Q	Q	Q	Q	Q	Interfaz VL/VH
39	44	I	K	K	K	K	K	
40	45	I	P	P	P	P	P	
41	46	I	G	G	G	G	G	
42	47	I	Q	Q	Q	Q	Q	
43	48	I	S	S	S	S	S	
44	49	I	P	P	P	P	P	Interfaz VL/VH (+)
45	50	I	K	Q	Q	Q	Q	
46	51	I	L	L	L	L	L	Interfaz VL/VH Zona de Vernier
47	52	I	L	L	L	L	L	Zona de Vernier
48	53	I	I	I	I	I*	I*	L2 1(7) canónico Zona de Vernier
49	54	FR2	Y	Y	Y	Y	Y	Zona de Vernier
50	55	CDR2	K	L	L	k	K	
51	56	I	V*	G*	G*	v*	v*	L2 1(7) canónico
52	57	I	S*	S*	S*	S*	S*	L2 1(7) canónico
53	58	I	N	N	N	N	N	
54	59	I	R	R	R	R	R	
55	60	I	L	A	A	I	L	
56	61	CDR2	Y	S	S	y	Y	
57	62	FR3	G	G	G	G	G	
58	63	I	V	V	V	V	V	
59	64	I	P	P	P	P	P	
60	65	I	D	D	D	D	D	
61	66	I	R	R	R	R	R	
62	67	I	F	F	F	F	F	
63	68	I	S	S	S	S	S	
64	69	I	G*	G*	G*	G*	G*	L2 1(7) canónico Zona de Vernier
65	70	I	S	S	S	S	S	
66	71	I	G	G	G	G	G	Zona de Vernier
67	72	I	S	S	S	S	S	
68	73	I	G	G	G	G	G	Zona de Vernier
69	74	I	T	T	T	T	T	Zona de Vernier
70	75	I	D	D	D	D	D	
71	76	I	F*	F*	F*	F*	F*	L1 4(16) canónico Zona de Vernier
72	77	I	T	T	T	T	T	
73	78	I	L	L	L	L	L	
74	79	I	K	K	K	K	K	
75	80	I	I	I	I	I	I	
76	81	I	S	S	S	S	S	
77	82	I	S	R	R	R	R	
78	83	I	V	V	V	V	V	
79	84	I	E	E	E	E	E	
80	85	I	A	A	A	A	A	

ES 2 283 759 T3

81	86		E	E	E	E	E	
82	87		D	D	D	D	D	
83	88		L	V	V	V	V	
84	89		G	G	G	G	G	
85	90		V	V	V	V	V	
86	91		Y	Y	Y	Y	Y	
87	92		Y	Y	Y	Y	Y	Interfaz VL/VH
88	93	FR3	C	C	C	C	C	
89	94	CDR3 F	F	M	M	f	F	Interfaz VL/VH
90	95		Q*	Q*	Q*	Q*	Q*	L3 1(9) canónico
91	96		G	A	A	g	G	Interfaz VL/NH
92	97		S	L	L	s	S	
93	98		H	Q	Q	h	H	
94	99		V	T	T	v	V	
95	100		P*	P*	P*	P*	P*	L3 1(9) canónico
96	101		W		Q	w	W	Interfaz VL/VH (+)
97	102	CDR3	T		T	T	T	
98	103	FR4	F		F	F	F	Interfaz VL/VH (+) Zona de Vernier
99	104		G		G	G	G	
100	105		G		Q	Q	Q	
101	106		G		G	G	G	
102	107		T		T	T	T	
103	108		K		K	K	K	
104	109		L		V	V	V	
105	110		E		E	E	E	
106	111		I		I	I	I	
107	112	FR4	K		K	K	K	

Leyenda: La primera columna (Kabat) indica la posición del resto de aminoácido según Kabat *et al.* (1991); la segunda columna (#) indica la posición del resto de aminoácido en la secuencia regular; la tercera columna (FR o CDR) se realizó para identificar fácilmente los segmentos del esqueleto (FR1, FR2, FR3 y FR4) y los segmentos de CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) ("CDR" para "región determinante de complementariedad") con las tres CDR separando los cuatro FR; la cuarta columna (cadena ligera 7C10 de ratón) representa la secuencia de aminoácidos (SEC ID nº 54) de la región VL del anticuerpo 7C10 de ratón; la quinta columna (línea germinal DPK15/A19 de humano) representa la secuencia de aminoácidos (SEC ID nº 59) de la cadena ligera V kappa II de humano de la línea germinal; la sexta columna (GM607) representa la secuencia de aminoácidos (SEC ID nº 58) de la región VL del anticuerpo GM607 de humano; la séptima y octava columnas (7C10 L 1 y 2 de humano remodeladas) representan las secuencias de aminoácidos del anticuerpo 7C10 VL humanizado 1 y 2 (respectivamente, SEC ID nº 61 y 65). "*" indica las partes de la estructura canónica del bucle de CDR, tal como se define por Chothia *et al.* (Nature, 342, 877-883, 1989).

Ejemplo 13

Procedimiento de humanización, mediante injerto de CDR, de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 7C10 (7C10 VH)

a) Comparación de la secuencia de aminoácidos de 7C10 VH con todas las secuencias de VH de ratón conocidas

Como etapa preliminar a la humanización mediante injerto de CDR, se comparó primero la secuencia de aminoácidos de 7C10 VH con todas las secuencias de VH de ratón presentes en el banco de datos de Kabat (dirección Internet: ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/database/kabat/fasta_format/, la última actualización de datos data de 1999). De esta manera, se ha identificado que 7C10 VH pertenece al subgrupo I(A) de las cadenas pesadas tal como se define por Kabat *et al.* (1991). Se identificaron regiones de VH de anticuerpos monoclonales de ratón que tienen una identidad de secuencias que varía hasta 90,5% (AN013³CL (SEC ID nº 70), véase la figura 22). A fin de intentar identificar los restos fuera de lo común en la secuencia de 7C10 VH, se alineó la secuencia de aminoácidos de 7C10 VH (SEC ID nº 69) con la secuencia consenso (SEC ID nº 71) del subgrupo I(A) de las cadenas pesadas de ratón, tal como se define por Kabat (véase la figura 22).

El resto 17 (numeración de Kabat), Thr para la secuencia consenso del subgrupo I(A) y Ser en 7C10 VH, está localizado sobre la superficie de la molécula del lado del interfaz con la región constante. Este resto no parece ser importante.

5 El resto 27 (numeración de Kabat), Asp para la secuencia consenso del subgrupo I(A) y Tyr en 7C10 VH, es un resto canónico para la CDR 1. Tyr en esta posición no es rara, y es probablemente crítica para mantener la CDR 1 en su conformación adecuada.

10 El resto 84 (numeración de Kabat), Thr para la secuencia consenso del subgrupo I(A) y Asn en 7C10 VH. Se encontró Asn 93 veces en VH de ratón, y 3 veces en VH de humano. Según el modelo molecular, es un resto de superficie remoto del paratopo.

15 La numeración de los aminoácidos es la de Kabat *et al.* (1991). Los restos en las regiones de estructura (aparte de las CDR) que difieren entre 7C10 VH y el subgrupo I(A) de ratón de Kabat, está subrayados. AN03'CL representa la secuencia de la cadena pesada de un anticuerpo de ratón (el número de acceso en el banco de datos de Kabat, es P001289).

20 b) Comparación de la secuencia de aminoácidos de 7C10 VH con todas las secuencias de VH de humano conocidas

A fin de identificar el mejor candidato de humano para el “injerto de CDR”, se buscó la región de VH de origen humano que tuviera la mayor homología posible con 7C10 VH. Para este fin, se comparó la secuencia de aminoácidos de 7C10 VH de ratón con todas las secuencias de VH de humano presentes en la base de datos de Kabat. El 7C10 VH de ratón tenía la mayor homología de secuencias con las regiones de VH del subgrupo II de humano, tal como se define por Kabat *et al.* (1991). Se identificaron regiones de VH de anticuerpos monoclonales de origen humano que tenían una identidad de secuencias que varía hasta 67,3% (VH FUR1'CL de humano (SEC ID n° 73, véase la figura 23), sobre la totalidad de los 98 aminoácidos codificados por el gen variable (es decir, aparte de la CDR3 y la región J). Se identificó también una línea germinal de origen humano, 4.22 VH IV (Sanz *et al.*, 1989), que tenía una identidad de secuencias de 68,4%, según los mismos criterios que para VH FUR1'CL (línea germinal de humano (SEC ID n° 74), véase la figura 23). La secuencia codificada por la línea germinal 4.22 VH IV se seleccionó como una secuencia de humano receptora de las CDR (según la definición de Kabat) de 7C10 VH de ratón, más que VH FUR1'CL, debido a que comparativamente, las secuencias de 4.22 VH IV y VH FUR1'CL con la de la secuencia consenso del subgrupo II de humano (sg II de humano de Kabat (SEC ID n° 72), véase la figura 23 y la tabla 6), no se pudo identificar ningún resto atípico en las regiones de estructura (Rch) para 4.22 VH IV, mientras que se identificó la presencia de dos restos atípicos (Gln y Arg en las posiciones 81 y 82A según la nomenclatura de Kabat, respectivamente) en la secuencia codificada por VH FUR1'CL.

40 c) Versiones humanizadas de 7C10 VH

La siguiente etapa en el procedimiento de humanización, consistió en unir las CDR de 7C10 VH de ratón a las regiones de estructura (Rch) de la línea germinal 4.22 VH IV de humano (Sanz *et al.*, 1989). En esta etapa del procedimiento, el modelo molecular de las regiones Fv de 7C10 de ratón, es particularmente útil en la elección de los restos de ratón que serán conservados por ser capaces de desempeñar una función en el mantenimiento de la estructura tridimensional de la molécula (estructura canónica de las CDR, interfaz VH/VL, etc.) o en la unión al antígeno (perteneciendo al paratopo). En las Rch, se examinó escrupulosamente cada diferencia entre las secuencias de aminoácidos de ratón (7C10 VH) y de humano (4.22 VH IV) (véase la Tabla 6). Además, los restos particulares en la secuencia de 7C10 VH de ratón que se habían identificado (véase el Ejemplo 8.a), se tomaron en cuenta, si fuese necesario.

50 En la primera versión de 7C10 VH humanizado mediante “injerto de CDR”, humanizada 1, se hicieron cuatro cambios en las regiones de estructura (Rch) de 4.22 VH IV (véase la Tabla 6, la figura 24 para la secuencia de aminoácidos (SEC ID n° 75), y la figura 25 para la secuencia de ADN (SEC ID n° 76 y 78) y la secuencia de aminoácidos que comprende el péptido de señal (SEC ID n° 77)). Estos cuatro cambios se refieren:

- 55 • Al resto 30 (nomenclatura de Kabat) situado en Rch 1. Este resto entra efectivamente en la composición estructural de la CDR1 de 7C10 VH (como se define por Chothia *et al.*, 1989) y, por lo tanto, podría ser crítico para mantener esta asa en su conformación correcta. La Thr presente en esta posición en la secuencia de 7C10 VH de ratón, se conserva por lo tanto en esta misma posición en la forma humanizada.
- 60 • Al resto 48 (nomenclatura de Kabat) situado en Rch 2. Este resto está cerca de las CDR, aunque de acuerdo al modelo molecular, no está en contacto directo con estas últimas, y podría influir sobre su conformación final. La metionina presente en esta posición en la secuencia 7C10 VH de ratón se conserva por lo tanto en esta misma posición en la forma humanizada 1.
- 65 • Al resto 67 (nomenclatura de Kabat) situado en Rch 3. Este resto está cerca de las CDR, y según el modelo molecular, podría entrar en contacto con la lisina 60 (nomenclatura de Kabat) en la CDR 2. La isoleucina

ES 2 283 759 T3

presente en esta posición en la secuencia 7C10 VH de ratón, se conserva por lo tanto en esta posición en la forma humanizada 1.

- Al resto (nomenclatura de Kabat) situado en Rch 3. Este resto forma parte de la estructura canónica de la CDR2 y, por lo tanto, debe ser crítico para mantener esta asa en su conformación correcta. La arginina presente en esta posición en la secuencia 7C10 VH de ratón se conserva por lo tanto en esta posición en la forma humanizada 1.

En la segunda versión de 7C10 VH humanizado mediante “injerto de CDR”, humanizada 2, se realizaron dos cambios en las regiones de estructura (Rch) de 4.22 VH IV. Estos dos cambios se refieren a los restos 30 y 71 (nomenclatura de Kabat), ya descritos en la forma humanizada 1 (véase la Tabla 6, figura 24 para la secuencia de aminoácidos (SEC ID n° 79), y figura 26 para la secuencia de ADN (SEC ID n° 80 y 82) y la secuencia de aminoácidos que comprende el péptido de señal (SEC ID n° 81)).

En la tercera forma de 7C10 VH humanizado mediante “injerto de CDR”, humanizada 3, no se realizó ningún cambio en las regiones de estructura (Rch) de 4.22 VH IV. Todos los restos de las Rch son, por lo tanto, de origen humano, incluyendo los restos 30, 48, 67 y 71 (nomenclatura de Kabat), que se han conservado (véase la Tabla 6, la figura 24 para la secuencia de aminoácidos (SEC ID n° 83) y la figura 27 para la secuencia de ADN (SEC ID n° 84 y 86), y la secuencia de aminoácidos que comprende el péptido de señal (SEC ID n° 85)). Esta forma humanizada 3 está, por lo tanto, totalmente humanizada (aparte, por supuesto, de las CDR mismas tal como se define por Kabat), puesto que todos los restos de las Rch, son los codificados por el gen de VH de la línea germinal 4.22 VH IV.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 6: Alineación de las secuencias de aminoácidos que llevan al diseño de las regiones de 7C10 VH de humano remodeladas

Kabat	FR o CDR	Cadena pesada de ratón 7C10	Línea germinal 4.22 VH IV	FUR1'CL VH de humano	7C10 H 1 de humano remodelada	7C10 H 2 de humano remodelada	7C10 H 3 de humano remodelada	Comentarios
1	FR1	D	Q	Q	Q	Q	Q	
2	I	V	V	V	V	V	V	Zona de Vernier
3	I	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
4	I	L	L	L	L	L	L	
5	I	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
6	I	E	E	E	E	E	E	
7	I	S	S	S	S	S	S	
8	I	G	G	G	G	G	G	
9	I	P	P	P	P	P	P	
10	I	G	G	G	G	G	G	
11	I	L	L	L	L	L	L	
12	I	V	V	V	V	V	V	
13	I	K	K	K	K	K	K	
14	I	P	P	P	P	P	P	
15	I	S	S	S	S	S	S	
16	I	Q	E	E	E	E	E	
17	I	S	T	T	T	T	T	
18	I	L	L	L	L	L	L	
19	I	S	S	S	S	S	S	
20	I	L	L	L	L	L	L	
21	I	T	T	T	T	T	T	
22	I	C	C	C	C	C	C	
23	I	S	T	T	T	T	T	
24	I	V	V	V	V	V	V	H1 2(6) canónica
25	I	T	S	S	S	S	S	H1 2(6) canónica
26	I	G*	G*	G*	G*	G*	G*	H1 2(6) canónica
27	I	Y*	Y*	Y*	Y*	Y*	Y*	H1 2(6) canónica
28	I	S	S	S	S	S	S	Zona de Vernier
29	I	I*	I*	I*	I*	I*	I*	Zona de Vernier

30	FR1	T	S	S	t	T	S	Zona de Vernier Zona de Vernier cerca de las CDR
31	CDR1	G	S	S	g	G	g	
32	I	G	G	G			G	
33	I	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
34	I	L	Y	Y	1	L	I	
35	I	W*	W*	W*	W*	W*	W*	H1 2(6) canónica interfaz VH/VL
35A	CDR1	N	G	G	n	N	n	
36	FR2	W	W	W	W	W	W	
37	I	I	I	I	I	I	I	Interfaz VH/VL
38	I	R	R	R	R	R	R	
39	I	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Interfaz VH/VL
40	I	F	P	P	P	P	P	
41	I	P	P	P	P	P	P	
42	I	G	G	G	G	G	G	
43	I	N	K	K	K	K	K	
44	I	K	G	G	G	G	G	
45	I	L	L	L	L	L	L	Interfaz VH/VL (+)
46	I	E	E	E	E	E	E	
47	I	W	W	W	W	W	W	Interfaz VH/VL Zona de vernier
48	I	M	I	I	m	I	I	Zona de Vernier cerca de las CDR
49	FR2	G	G	G	G	G	G	Zona de Vernier
50	CDR2	Y	S	S	Y	Y	Y	
51	I	I	I	M	I	I	I	
52	I	S	Y	F	S	S	s	
53	I	Y	H	H	Y	Y	Y	
54	I	D	S	S	d	D	d	
55	I	G*	G*	G*	G*	G*	G*	H2 1(16) canónica
56	I	T	S	S	t	T	t	
57	I	N	S	S	n	N	n	
58	I	N	Y	Y	n	N	n	
59	I	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
60	I	K	N	N	k	K	k	
61	I	P	P	P	P	P	P	
62	I	S	S	S	S	S	S	
63	I	L	L	L	L	L	L	

64	I	K	K	K	K	K	K
65	CDR2	D	S	d	d	d	
66	FR3	R	R	R	R	R	
67	I	I	V	i	v	v	Zona de Vernier cerca de las CDR
68	I	S	T	T	T	T	
69	I	I	I	I	I	I	Zona de Vernier
70	I	T	S	s	s	s	
71	I	R*	V*	r*	v*	v*	H2 1(16) canónica Zona de Vernier
72	I	D	D	D	D	D	
73	I	T	T	T	T	T	Zona de Vernier
74	I	S	S	S	S	S	
75	I	K	K	K	K	K	
76	I	N	N	N	N	N	
77	I	Q	Q	Q	Q	Q	
78	I	F	F	F	F	F	Zona de Vernier
79	I	F	S	s	f	s	
80	I	L	L	L	L	L	
81	I	K	K	K	K	K	
82	I	L	L	L	L	L	
82A	I	N	S	s	n	s	
82B	I	S	S	S	S	S	
82C	I	V	V	V	V	V	
83	I	T	T	T	T	T	
84	I	N	A	a	n	a	
85	I	E	A	a	e	a	
86	I	D	D	D	D	D	
87	I	T	T	T	T	T	
88	I	A	A	A	A	A	
89	I	T	V	v	t	v	
90	I	Y	Y	y	y	y	
91	I	Y	Y	y	y	y	
92	I	C	C	c	c	c	Interfaz VH/VL
93	I	A	A	a	a	a	
94	FR3	R*	R*	R*	R*	R*	Interfaz VH/VL Zona de Vernier
95	CDR3	Y	G	y	g	y	H1 2(6) canónica Zona de Vernier
96	I	G	R	g	r	g	Interfaz VH/VL
97	I	R	Y	r	y	r	

98	I	V	C	V	V	V	
99	I	F	S	f	f	f	
100	I		S				
100A	I		T				
100b	I		S				
100c	I		C				
100D	I		N				
100E	I		W				
100K	I	F	F	f	f	f	Interfaz VH/VL (+)
101	I	D	D	d	d	d	
102	CDR3	Y	P	Y	Y	Y	
103	FR4	W	W	W	W	W	interfaz VH/VL (+) Zona de Vernier
104	I	G	G	G	G	G	
105	I	Q	Q	Q	Q	Q	
106	I	G	G	G	G	G	
107	I	T	T	T	T	T	
108	I	T	L	L	L	L	
109	I	L	V	V	V	V	
110	I	T	T	T	T	T	
111	I	V	V	V	V	V	
112	I	S	S	S	S	S	
113	FR4	S	S	S	S	S	

Leyenda: La primera columna (Kabat) indica la posición del resto de aminoácido según Kabat *et al.* (1991); la segunda columna (FR o CDR) se realiza para identificar fácilmente los segmentos del esqueleto (FR1, FR2, FR3 y FR4) y los segmentos de CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) con las tres CDR que separa los cuatro FR; la tercera columna (cadena pesada 7C10 de ratón) representa la secuencia de aminoácidos (SEC ID nº 69) de la región de V_H del anticuerpo 7C10 de ratón; la cuarta columna (línea germinal 4.22 VH IV) representa la secuencia de aminoácidos del gen de 4.22 VH IV (Sanz *et al.*, 1989) (SEC ID nº 74); la quinta columna (FUR1'CL VH de humano, número de acceso de Kabat N020619) representa la secuencia de aminoácidos (SEC ID nº 73) de antilamina-B de IgMK de origen humano (Marette *et al.*, 1993); la sexta, séptima y octava columnas (7C10 H 1, 2 y 3 de humano remodeladas) representan, respectivamente, las secuencias de aminoácidos de la región V_H de 7C10 de humano para las versiones remodeladas 1 (SEC ID nº 75), 2 (SEC ID nº 79) y 3 (SEC ID nº 83). "*" indica las partes de la estructura canónica del bucle de CDR, tal como se define por Chothia *et al.* (1989)

Ejemplo 14

Construcción de los genes que codifican las versiones humanizadas 1 de 7C10 VL y VH mediante ensamble de oligonucleótidos

a) Principio

Se sintetizaron los genes (péptido líder + regiones variables VDJ para VH o VJ para VK) que codifican las regiones variables humanizadas, mediante ensamble de fase sólida sobre perlas magnéticas revestidas con estreptavidina. Los genes que codifican 7C10 VH humanizado (445 pares de bases) y 7C10 VL humanizado (433 pares de bases), se construyen fusionando dos fragmentos de ADN gracias a la presencia de un sitio de restricción KpnI presente en las dos secuencias, y situado casi a la mitad del gen (a 200 y 245 nucleótidos con relación al extremo 5' del gen para VL y VH, respectivamente). Los dos fragmentos que se fusionan entre sí se ensamblan por sí mismos mediante una técnica de ensamble que consiste en usar oligonucleótidos fosforilados (de aproximadamente 30 a 35 elementos) hibridados dos por dos (un oligonucleótido sentido y el otro antisentido, con una homología de aproximadamente 50%), de manera que se solapen durante la elongación. Un primer oligonucleótido biotinilado en la posición 5' se fija a las perlas magnéticas, y entonces los pares de oligonucleótidos fosforilados se añaden uno por uno. El enlace fosfodiéster entre los oligonucleótidos fosforilados yuxtapuestos se realiza mediante la enzima ADN ligasa T4.

Los genes así sintetizados *de novo* se pueden clonar directamente (mediante digestión con enzimas de restricción compatibles con el vector de expresión seleccionado), o se puede amplificar mediante PCR para obtener más material como preámbulo a la clonación direccional mediante digestión enzimática. La secuencia del gen construido de esta manera mediante ensamble *de novo*, se verifica entonces mediante secuenciación automática del ADN.

b) Protocolo experimental de la técnica de ensamble *de novo*

Se ordenaron oligonucleótidos fosforilados en la posición 5' o biotinilados en la posición 5', cuya concentración se ajustó a 100 μ M en MWG Biotech (véase las secuencias de los oligonucleótidos usados en la Tabla 7 para la construcción de 7010 VL humanizado, y la Tabla 8 para la construcción de 7C10 VH humanizado). Los oligonucleótidos fueron hibridados en pares (una mezcla equimolar, 500 pmoles, de un oligonucleótido sentido y de un oligonucleótido antisentido en el tampón de ADN ligasa T4, se calienta a 95°C durante 5 minutos, y después se deja enfriar sobre la mesa de trabajo hasta temperatura ambiente), según un esquema descrito en la Tabla 9.

El primer oligonucleótido biotinilado se fija sobre perlas magnéticas revestidas con estreptavidina (estreptavidina Dynabeads M-280, producto N° 112-05 de Dynal). Para eso, se añaden 500 pmoles del oligonucleótido biotinilado en una disolución de 15 mM de NaCl a 50 mM a 50 μ l de perlas decantadas (se usa un portaimán) lavadas previamente dos veces con 100 μ l de tampón TE 1X (tampón de 100X de Tris-EDTA: Tris-HCl a 1M, pH 8, 0,1M de EDTA, Sigma T-9285). Después de incubar a 37°C durante 15 minutos, las perlas se lavan dos veces con tampón de lavado (10 mM de Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM de EDTA y 50 mM de NaCl), y los pares de oligonucleótidos hibridados se añaden entonces uno por uno. En cada adición nueva de un par de oligonucleótidos, la mezcla se calienta hasta 95°C durante 5 minutos, y se deja entonces enfriando sobre la mesa de trabajo hasta temperatura ambiente. Una vez que se alcanza la temperatura ambiente, se añaden 2 μ l de 10 U/ μ l de ADN ligasa T4 (Biolabs), y la mezcla se incuba durante 20 minutos a 37°C. Las perlas se lavan entonces (tampón de lavado), y los siguientes pares de oligonucleótidos se añaden entonces en sucesión.

El último oligonucleótido no apareado (antisentido) se ensambla de la siguiente manera. Se añaden 5 μ l de oligonucleótido (500 pmoles) y 43 μ l de tampón de ADN ligasa T4 a las perlas decantadas, y entonces la mezcla se calienta a 95°C durante 5 minutos, y se deja enfriar sobre la mesa de trabajo hasta temperatura ambiente. Una vez que se alcanza la temperatura ambiente, se añaden 2 μ l de ADN ligasa T4, y la mezcla se incuba a 37°C durante 20 minutos. Después, las perlas se lavan dos veces con el tampón de lavado, y después dos veces con el tampón TE 1X.

Las perlas se pueden conservar entonces a 4°C antes de proceder a la clonación y secuenciación del gen ensamblado *de novo*.

ES 2 283 759 T3

TABLA 7

Secuencia de ADN de oligonucleótidos usados para la construcción de 7C10 VL 1 humanizado mediante ensamble de novo

5	MluI Líder.biotina	5'-GTCAGAACGCGTGCCGCC	(SEC ID nº 87)
	7C10Lresh.1sentido	5'-ACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT	(SEC ID nº 88)
	7C10Lresh.2sentido	5'-GATGTTCTGGTTTCTGCTTCCAGCAGTGATG	(SEC ID nº 89)
	7C10Lresh.3sentido	5'-TTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCC	(SEC ID nº 90)
10	7C10Lresh.4sentido	5'-GTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTG	(SEC ID nº 91)
	7C10Lresh.5sentido	5'-CAGGTCTAGTCAGACCATTATACATAGTAATG	(SEC ID nº 92)
	7C10Lresh.6sentido	5'-GAAACACCTATTTGGAATGGTACCTGCAGA	(SEC ID nº 93)
	7C10Lresh.7antisentido	5'-GGCAACTTCATGGTGGCGGCACGCGTTCTGAC	(SEC ID nº 94)
	7C10Lresh.8antisentido	5'-GAAACCAGAACATCAGCACCAACAGCCTAACA	(SEC ID nº 95)
15	7C10Lresh.9antisentido	5'-CTGAGTCATCACAACATCACTGCTGGAAGCAG	(SEC ID nº 96)
	7C10Lresh.10antisentido	5'-TCTCCAGGGGTGACGGCAGGGAGAGTGGAGA	(SEC ID nº 97)
	7C10Lresh.11antisentido	5'-TCTGACTAGACCTGCAGGAGATGGAGGCCGGC	(SEC ID nº 98)
	7C10Lresh.12antisentido	5'-AAATAGGTGTTTCCATTACTATGTACAATGC	(SEC ID nº 99)
20	7C10Lresh.13sentido	5'-CAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATAAA	(SEC ID nº 100)
	7C10Lresh.14sentido	5'-GTTTCTAATCGGCTTTATGGGGTCCCTGACAG	(SEC ID nº 101)
	7C10Lresh.15sentido	5'-GTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTA	(SEC ID nº 102)
	7C10Lresh.16sentido	5'-CACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGAT	(SEC ID nº 103)
	7C10Lresh.17sentido	5'-GTTGGGGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTTACA	(SEC ID nº 104)
25	7C10Lresh.18sentido	5'-TGTTCCGTGGACGTTCCGCCAAGGGACCAAGG	(SEC ID nº 105)
	7C10Lresh.19sentido	5'-TGGAAATCAAACGTGAGTGGATCCTCTGCG	(SEC ID nº 106)
	7C10Lresh.KpnI REV	5'-TCTGCAGGTACCATTCG	(SEC ID nº 107)
	7C10Lresh.KpnI biotina	5'-TGCAATGGTACCTGCAGAAGC	(SEC ID nº 108)
	7C10Lresh.20antisentido	5'-AGACTGCCCTGGCTTCTGCAGGTACCATTCGA	(SEC ID nº 109)
30	7C10Lresh.21antisentido	5'-CGATTAGAACTTTATAGATCAGGAGCTGTGG	(SEC ID nº 110)
	7C10Lresh.22antisentido	5'-TGCCACTGAACCTGTCAGGGACCCCATAAAGC	(SEC ID nº 111)
	7C10Lresh.23antisentido	5'-GATTTTCAGTGTAAAATCTGTGCCTGATCCAC	(SEC ID nº 112)
	7C10Lresh.24antisentido	5'-TAAACCCCAACATCCTCAGCCTCCACTCTGCT	(SEC ID nº 113)
	7C10Lresh.25antisentido	5'-TCCACGGAACATGTGAACCTTGAAAGCAGTAA	(SEC ID nº 114)
35	7C10Lresh.26antisentido	5'-TTTGATTTCCACCTTGGTCCCTTGCCCGAAC	(SEC ID nº 115)
	7C10Lresh.BamHI antisentido	5'-CGCAGAGGATCCACTCACG	(SEC ID nº 116)

ES 2 283 759 T3

TABLA 8

Secuencia de ADN de oligonucleótidos usados para la construcción de 7C10 VH 1 humanizado mediante ensamble de novo

5	Mlul Líder.biotina	5'-GTCAGAACGCGTGCCGCC	(SEC ID nº 117)
	7C10Hresh.1sentido	5'-ACCATGAAAGTGTTGAGTCTGTTGTACCTCTTGA	(SEC ID nº 118)
	7C10Hresh.2sentido	5'-CAGCCATTCTGGTATCCTGTCTCAGGTGCAGCT	(SEC ID nº 119)
10	7C10Hresh.3sentido	5'-TCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG	(SEC ID nº 120)
	7C10Hresh.4sentido	5'-GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGT	(SEC ID nº 121)
	7C10Hresh.5sentido	5'-TACTCCATCACCGGTGGTTATTTATGGAAGTGG	(SEC ID nº 122)
	7C10Hresh.6sentido	5'-ATACGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGG	(SEC ID nº 123)
	7C10Hresh.7sentido	5'-ATGGGGTATATCAGCTACGACGGTACCAATAAC	(SEC ID nº 124)
15	7C10Hresh.8antisentido	5'-TCAACACTTTCATGGTGGCGGCACGCGTTCTGAC	(SEC ID nº 125)
	7C10Hresh.9antisentido	5'-ATACCAGGAATGGCTGTCAAGAGGTACAACAGAC	(SEC ID nº 126)
	7C10Hresh.10antisentido	5'-TGGGCCCCGACTCCTGAAGCTGCACCTGAGACAGG	(SEC ID nº 127)
	7C10Hresh.11antisentido	5'-TGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGCTTCACCAAGTCC	(SEC ID nº 128)
	7C10Hresh.12antisentido	5'-CCACCGGTGATGGAGTAACCAGAGACAGTGCAGG	(SEC ID nº 129)
20	7C10Hresh.13antisentido	5'-CCCTGGGGGCTGCCGTATCCAGTTCATAAATAA	(SEC ID nº 130)
	7C10Hresh.14antisentido	5'-TAGCTGATATACCCCATCCACTCCAGTCCCTT	(SEC ID nº 131)
	7C10Hresh.KpnIREV	5'-GTTATTGGTACCGTCTG	(SEC ID nº 132)
	7C10Hresh.KpnIbiotina	5'-TACGACGGTACCAATAACTAC	(SEC ID nº 133)
	7C10Hresh.15sentido	5'-AAACCCTCCCTCAAGGATCGAATCACCATATC	(SEC ID nº 134)
25	7C10Hresh.16sentido	5'-ACGTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA	(SEC ID nº 135)
	7C10Hresh.17sentido	5'-AGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACTGCA	(SEC ID nº 136)
	7C10Hresh.18sentido	5'-GTGTATTACTGTGCGAGATACGGTAGGGTCTT	(SEC ID nº 137)
	7C10Hresh.19sentido	5'-CTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCA	(SEC ID nº 138)
	7C10Hresh.20sentido	5'-CCGTCTCCTCAGGTGAGTGGATCCTCTGCG	(SEC ID nº 139)
30	7C10Hresh.21antisentido	5'-AGGGAGGGTTTGTAGTTATTGGTACCGTCGTA	(SEC ID nº 140)
	7C10Hresh.22antisentido	5'-ACGTGTCACGTGATATGGTGATTTCGATCCTTG	(SEC ID nº 141)
	7C10Hresh.23antisentido	5'-AGAGCTCAGCTTCAGGGAGAAGTGGTCTTGG	(SEC ID nº 142)
	7C10Hresh.24antisentido	5'-CAGTAATACACTGCAGTGTCCGCAGCGGTCAC	(SEC ID nº 143)
	7C10Hresh.25antisentido	5'-AGTAGTCAAAGAAGACCCTACCGTATCTCGCA	(SEC ID nº 144)
35	7C10Hresh.26antisentido	5'-CTGAGGAGACGGTGACCAGGGTCCCTGGCCCC	(SEC ID nº 145)
	7C10Hresh.BamHiantisentido	5'-CGCAGAGGATCCACTCAC	(SEC ID nº 146)

40

45

50

55

60

65

ES 2 283 759 T3

TABLA 9

Protocolo de apareamiento de oligonucleótidos para el ensamble de novo de genes que codifican las formas humanizadas de 7C10 VH y VL

5	Ensamble <i>de novo</i> del fragmento Mlul-KpnI de 7C10 VL humanizado 1	Ensamble <i>de novo</i> del fragmento KpnI-BamHI de 7010 VL humanizado 1
10	Oligonucleótido líder biotinilado MIUI 7010 VL	Oligonucleótido biotinilado 7010 VL KpnI
15	Par de oligonucleótidos 1 y 7 Par de oligonucleótidos 2 y 8 Par de oligonucleótidos 3 y 9 Par de oligonucleótidos 4 y 10 Par de oligonucleótidos 5 y 11 Par de oligonucleótidos 6 y 12	Par de oligonucleótidos 13 y 20 Par de oligonucleótidos 14 y 21 Par de oligonucleótidos 15 y 22 Par de oligonucleótidos 16 y 23 Par de oligonucleótidos 17 y 24 Par de oligonucleótidos 18 y 25
20	Oligonucleótido antisentido 7C10 VL KpnI	Oligonucleótido antisentido 7C10 VL BamHI
25	Ensamble <i>de novo</i> del fragmento MIUI-KpnI de 7C10 VL humanizado 1	Ensamble <i>de novo</i> del fragmento KpnI-BamHI de 7010 VL humanizado 1
30	Oligonucleótido líder biotinilado MIUI 7010 VH	Oligonucleótido biotinilado 7010 H KpnI
35	Par de oligonucleótidos 1 y 8 Par de oligonucleótidos 2 y 9 Par de oligonucleótidos 3 y 10 Par de oligonucleótidos 4 y 11 Par de oligonucleótidos 5 y 12 Par de oligonucleótidos 6 y 13 Par de oligonucleótidos 7 y 14	Par de oligonucleótidos 15 y 21 Par de oligonucleótidos 16 y 22 Par de oligonucleótidos 17 y 23 Par de oligonucleótidos 18 y 24 Par de oligonucleótidos 19 y 25 Par de oligonucleótidos 20 y 26
40	Oligonucleótido antisentido 7C10 VH KpnI	Oligonucleótido antisentido 7C10 VH BamHI
45	Ejemplo 15	
	<i>Construcción de los genes que codifican las versiones humanizadas 2 de 7C10 VL y 7C10 VH y 3 de 7C10 VH mediante mutagénesis dirigida</i>	
50	Se obtuvo la versión humanizada 2 de 7C10 VH mediante mutagénesis dirigida de los restos 48 y 67 (según la nomenclatura de Kabat) de la versión 1. Esta mutagénesis dirigida se llevó a cabo con la ayuda del sistema de mutagénesis dirigida a sitio QuickChange™ de Stratagene (kit #200518) según el protocolo descrito por el fabricante. La construcción se lleva a cabo en dos etapas, en una primera etapa el resto 48 en la versión 1 fue mutado con la ayuda del par de cebadores 7C10humanizado1QCM48 sentido y antisentido (véase la Tabla 10), y en una segunda etapa esta versión fue mutada en el resto 48 que fue por sí mismo mutado en el resto 67 con la ayuda del par de cebadores 7C10humanizado1QC167 sentido y antisentido (véase la Tabla 10).	
55		
60	Se obtuvo la versión humanizada 3 de 7C10 VH mediante mutagénesis dirigida de los restos 30 y 71 (según la nomenclatura de Kabat) de la versión 2, usando igualmente el sistema QuickChange™. Esta construcción se lleva a cabo en dos etapas. En un primer tiempo, el resto 30 en la versión 2 fue mutado con la ayuda de los cebadores 7C10humanizadoQCT30 sentido y antisentido (véase la Tabla 10). En un segundo tiempo, esta versión mutada en el resto 30 fue mutada por sí misma en el resto 71 usando el par de cebadores 7C10humanizado1V67QCR71 sentido y antisentido (véase la Tabla 10).	
65	Se obtuvo la versión humanizada 2 de 7C10 VL mediante mutagénesis dirigida del resto 2 (según la nomenclatura de Kabat) de la versión 1, usando el sistema QuickChange™. El resto 2 en la versión 1 fue mutado usando el par de cebadores 7C10humanizado1QCV2 sentido y antisentido (véase la Tabla 10).	

TABLA 10 Lista de los oligonucleótidos usados para la mutagénesis dirigida mediante el sistema QuickChange™ de Stratagene

7c10Hhumanizado1QCT30.sentido	5'-CTGGTTACTCCATCAGCGGTGGTTATTATG	(SEC ID nº 147)
7C10Rhumanizado1QCT30.antisentido	5'-CATAAATAACCAACCGCTGATGGAGTAACCCAG	(SEC ID nº 148)
7C10Hhumanizado1QCM48.sentido	5'-GGGACTGGAGTGGATCGGGTATATCAGCTAC	(SEC ID nº 149)
7C10Hhumanizado1QCM48antisentido	5'-GTAGCTGATATACCCGATCCACTCCAGTCCC	(SEC ID nº 150)
7C10Hhumanizado1QCl67.sentido	5'-TCCCTCAAGGATCGAGTCAACCATATCACGTG	(SEC ID nº 151)
7C10Hhumanizado1QCl67.antisentido	5'-CACGTGATATGGTGAATCGATCCTTGAGGGA	(SEC ID nº 152)
7C10Hhumanizado1V67CR71.sentido	5'-GATCGAGTCACCATATCAGTGGACACGTCCAAGAA CCAG	(SEC ID nº 153)
7C10Hhumanizado1V67QCR71.antisentido	5'-CTGGTTCTTGGACGTGTCCACTGATATGGTGACTC GATC	(SEC ID nº 154)
7C10Lhumanizado1QCV2.sentido	5'-GCTTCCAGCAGTGATATTGTGATGACTCAGT	(SEQ D Nº 155)
7C10Lhumanizado1QCV2.antisentido	5'-ACTGAGTCATCAACAATATCAGTGTGGAAGC	(SEC ID nº 136)

Ejemplo 16

Transfección de las células cos7 mediante electroporación

5 Se ensayaron los vectores de expresión de mamífero que contienen las versiones quimérica o humanizada de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo 7C10 en células cos7 para la expresión transitoria de los anticuerpos recombinantes 7C10. Se introdujo el ADN en las células cos mediante electroporación con la ayuda de un instrumento de BioRad (Gene Pulsar). Se añade el ADN (10 μ g de cada vector) a alícuotas de 0,8 ml de células cos a una concentración de 1×10^7 células por ml en un tampón de PBS (sin Ca^{++} y Mg^{++}). Se suministró una pulsación de 1900 voltios y una capacidad de 25 μ F. Se añaden entonces las células cos transfectadas a 8 ml de medio DMEM que contiene 5% de suero de ternera, y se incuban a 37°C durante 72 horas. Entonces, el sobrenadante se colecta, se centrifuga para eliminar los restos celulares, y se ensaya mediante ELISA para la medir su concentración de anticuerpo recombinante 7C10 de tipo kappa de IgG1/humano.

Ejemplo 17

Método de ELISA para medir las concentraciones de anticuerpos recombinantes kappa de IgG1/humano presentes en el sobrenadante de los transfectantes de células cos

20 Los sobrenadantes producidos mediante expresión transitoria en células cos7, se ensayaron para la presencia de anticuerpo 7C10 de tipo kappa de IgG1/humano. Para la detección de la inmunoglobulina kappa de IgG1/humano, se revistieron placas de ELISA de 96 pocillos (Maxisorb, Nunc) con un anticuerpo policlonal de IgG anti-humano de cabra (específico para el fragmento Fc gamma, Jackson Immuno-Research Laboratories Inc., #109-005-098). Los sobrenadantes de células cos se diluyeron en serie, y se añadieron a los pocillos revestidos. Después de incubación durante 1 hora a 37°C y lavar, se añadió un anticuerpo policlonal de cadena ligera kappa anti-humano de cabra conjugado con peroxidasa (HRP, Sigma, A-7164). Después de incubación durante 45 minutos a 37°C y lavar, se añadió el sustrato de TMB (KPL #50-76-04). Después de incubación durante 10 minutos, la reacción se detuvo mediante adición de 1M de ácido sulfúrico, y se leyó la densidad óptica a 450 nm. Se usó una inmunoglobulina kappa de IgG1/humano purificada de humano (Sigma, 1-3889) de concentración conocida, como anticuerpo de referencia estándar.

Ejemplo 18

Método de ELISA para determinar la actividad de reconocimiento de anticuerpos recombinantes 7C10 de tipo IgG1/kappa de humano sobre el receptor para IGF-1 (IGF-IR)

35 Se ensayaron los sobrenadantes de cultivo cos7 para determinar su capacidad para reconocer el IGF-1 R mediante un método de ELISA. Se revistieron placas de ELISA de 96 pocillos (Dynex Immulon 2HB) con 100 μ l por pocillo de una disolución de PBS que contenía 0,31 ng/ μ l de IGF-1R (receptor soluble del factor de crecimiento I tipo insulina de humano, R&D Systems, #391-GR), mediante incubación durante una noche a 4°C. Después de lavar con PBS que contenía 0,05% de Tween 20, las placas se saturaron mediante la adición de una disolución de PBS que contenía 0,5% de gelatina, y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Después de tres lavados con PBS, se añadieron a las placas las muestras de sobrenadantes cos que se van a ensayar, diluidas previamente en serie en PBS que contenía 0,1% de gelatina y 0,05% de Tween 20. Después de incubación a 37°C durante 1 hora, seguido de tres lavados (PBS que contenía 0,05% de Tween 20), se añadió un anticuerpo IgG anti-humano (específico para el fragmento Fc) conjugado con peroxidasa (HRP, Jackson Immuno-Research Laboratories Inc., #109-035-098) (dilución a 1/5000 en PBS que contenía 0,1% de gelatina y 0,05% de Tween 20). Después de incubación durante 45 minutos a 37°C y lavar tres veces (PBS que contenía 0,05% de Tween 20), se añadió el sustrato de TMB (KPL #50-76-04). Después de incubación durante 10 minutos, la reacción se detuvo mediante adición de 1M de ácido sulfúrico, y se leyó la densidad óptica a 450 nm.

Ejemplo 19

Determinación de la actividad de reconocimiento del IGF1-R para las diferentes versiones del anticuerpo 7C10 humanizado mediante "injerto de CDR"

55 En un primer tiempo, se comparó la actividad de reconocimiento de las formas humanizadas 1 de las cadenas pesadas y ligeras de 7C10 para el receptor IGF-1, con relación a la forma quimérica. La figura 28 muestra los resultados de un ensayo de ELISA de reconocimiento del IGF-1R (véase el Ejemplo 18) a partir del sobrenadante de las células cos7, cuya concentración de kappa de IgG1/humano se había determinado previamente mediante ELISA (véase el Ejemplo 17). Las curvas de calibración de los cuatro anticuerpos recombinantes ensayados se solapan perfectamente, indicando que sus afinidades relativas para el IGF-IR son muy similares. Se concluye por lo tanto que la forma humanizada 1 de 7C10, compuesta de la cadena ligera humanizada 1 (un solo resto de ratón presente en las regiones de estructura) en combinación con la cadena pesada humanizada 1 (4 restos de ratón presentes en las regiones de estructura), reconoce específicamente al receptor IGF-1, y tiene una afinidad muy similar a la del anticuerpo quimérico (regiones variables de ratón).

65 En un segundo tiempo, se observaron la influencia del resto 2 (según la nomenclatura de Kabat) de la cadena ligera humanizada de 7C10 (versión humanizada 1 contra humanizada 2, véase la figura 19), sobre el reconocimiento del IGF-IR. La figura 29 muestra los resultados del ensayo de ELISA para reconocimiento del IGF-IR (véase el Ejemplo

18) a partir de sobrenadantes de células cos7 cuya concentración de kappa de IgG1/humano se había determinado previamente mediante ELISA (véase el Ejemplo 17). Las dos versiones humanizadas 1 y 2 de la cadena ligera, se habían combinado exitosamente con 7C10 VH 1 humanizado. Las curvas de titulación de las dos combinaciones se superponen, indicando que la mutación del resto 2 de la cadena ligera, que ha sido cambiada de una valina en la versión humanizada 1 para una isoleucina en la forma humanizada 2, aparentemente, no tiene ninguna influencia sobre la afinidad de reconocimiento del receptor IGF1. La forma humanizada 2 de la cadena ligera de 7C10 constituye de esta manera una versión en la que no se ha conservado ningún resto de ratón (aparte de las CDR). Esta versión, totalmente humanizada, representa la versión preferida de 7C10 VL.

Se ensayó la versión totalmente humanizada de la cadena ligera de 7C10 (versión humanizada 2, véase anteriormente), en combinación con las tres versiones humanizadas de la cadena pesada de 7C10. La figura 30 muestra los resultados del ensayo de ELISA para reconocimiento del IGF-1R de sobrenadantes de células cos7, cuya concentración de kappa de IgG1/humano se había determinado previamente mediante ELISA (véase el Ejemplo 17). Las curvas de titulación son muy similares, y se solapan prácticamente con la curva de referencia que corresponde al anticuerpo quimérico, indicando que las tres versiones humanizadas 1, 2 y 3 de 7C10 VH dan una misma afinidad relativa para el IGF-1R cuando se combinan con 7C10 VL 2 humanizado. Otros ensayos de ELISA realizados en paralelo (resultados no mostrados), han revelado sin embargo que una mutación puntual del resto 71 (nomenclatura de Kabat) de una arginina (ratón) a una valina (humano), llevaba a una pequeña pérdida de afinidad del anticuerpo correspondiente, por el IGF-1 R. De esta manera, es razonable pensar que el 7C10 VH 2 humanizado tiene la misma afinidad relativa por el IGF-1R que el 7C10 VH 1 humanizado. Esta forma humanizada 2 se preferirá por lo tanto con relación a la forma 1, puesto que tiene sólo dos aminoácidos de ratón (restos 30 y 71, véase la figura 24). La forma humanizada 3, que no tiene más restos de ratón (aparte de las CDR), se preferirá también, puesto que sólo parece incluir una pérdida mínima de afinidad.

En conclusión, aparece que se prefieren particularmente dos formas humanizadas del anticuerpo 7C10 según la presente invención. Una forma constituida por la combinación de 7C10 VH 2 humanizado (2 restos conservados de ratón) con 7C10 VL 2 humanizado (sin resto conservado de ratón), y otra forma constituida por la combinación de 7C10 VH 3 humanizado (sin resto conservado de ratón) con 7C10 VL 2 humanizado (sin resto conservado de ratón). Esta última forma constituye la última versión humanizada, puesto que ningún resto de ratón está presente al mismo tiempo en las cadenas pesadas y ligeras.

Ejemplo 20

Expresión del EGFR y del IGF-IR sobre la superficie de células A549

Se estudió la sinergia de acción obtenida mediante la coadministración de dos ACM dirigidos respectivamente contra el IGF-IR y el EGFR en ratones atímicos que poseen un tumor pulmonar de células no pequeñas establecido mediante inyección subcutánea (s.c.) de células A549 (línea celular de carcinoma pulmonar).

En un primer tiempo, y a fin de asegurar la presencia de los dos receptores IGF-IR y EGFR sobre la superficie de la célula A549 antes de inyectar ésta en el ratón, se llevó a cabo un marcado para lectura de FACS de estas células con, respectivamente, el ACM anti-IGF-IR 7C10 murino (figura 37B) y el ACM anti-EGFR 225 murino (figura 37D). Para eso, las células se saturaron durante 30 minutos a 4°C con una disolución de 10% de PBS y SVF (suero de ternera fetal), se lavaron, y después se incubaron durante 30 minutos a 4°C con el ACM de interés. Después de otros 3 nuevos lavados, se añadió el anticuerpo anti-especie secundario acoplado a FITC (isotiocianato de fluoresceína). Después de incubar durante 30 minutos, se realiza la lectura en el FACS (distribuidor de células activado por fluorescencia) a 520 nm (excitación a 488 nm).

Los resultados presentados en las figuras 37A a 37D, muestran que las células A549 tienen sobre su superficie un número comparable de receptores para EGF e IGF1. En los dos casos, la población es homogénea con relación a la distribución de cada uno de los receptores. La especificidad del marcado se confirma mediante el uso de un isotipo de control (figura 37C). Estos resultados validan el uso de las células A549 como un modelo para el estudio de una sinergia de acción sobre dos receptores IGF-IR y EGFR, y para el estudio de una colaboración de estos dos receptores.

Ejemplo 21

Sinergia de acción de un ACM anti-IGF-IR y de un ACM anti-EGFR coadministrados in vivo, en el ratón atímico en el contexto de un tratamiento antitumoral

Para este estudio, se injertan s.c. $5 \cdot 10^6$ células A549 en ratones atímicos. Cinco días después del injerto de las células, se miden los tumores, y se constituye un lote homogéneo de ratones en términos de volumen del tumor. A partir de este lote, se generan al azar grupos de 6 ratones. Estos ratones se tratan intraperitonealmente (i.p.), dos veces por semana con cada uno de los ACM 7C10 y 225 individualmente con una dosis de 250 μ g/ratón, o con los dos ACM en coadministración. El ACM 9G4 se administra como un isotipo de control del experimento.

Los resultados presentados en la figura 38 muestran que cada uno de los anticuerpos 7C10 y 225 administrados solos, es capaz de inducir una disminución significativa en el crecimiento del tumor *in vivo*. Se puede observar que los dos ACM ensayados tienen una actividad comparable sobre el crecimiento del tumor A549. De manera sorprendente

con relación a la bibliografía, se observa una sinergia significativa durante la administración simultánea de los dos ACM ($p < 0,01$ en cada uno de los tiempos de la cinética en un ensayo *t*), sugiriendo que existe una colaboración de los dos receptores para el crecimiento óptimo de un tumor *in vivo* y que, contrariamente a los datos en la bibliografía, el bloqueo de uno de los dos ejes no basta para inhibir totalmente el crecimiento mediado por el segundo.

Ejemplo 22

Estudio de la actividad antitumoral de los anticuerpos murinos 7C10 y 225 coadministrados en ratones implantados ortotópicamente con células A549

El uso de modelos ortotópicos para la evaluación de la actividad antitumoral presenta un interés particular con relación al procedimiento de diseminación metastásica de un tumor. A fin de evaluar la actividad antitumoral de una mezcla de anticuerpos dirigidos respectivamente contra el IGF-IR y el EGFR, se implantaron 10^6 células A549 (cáncer pulmonar de células no pequeñas) en la cavidad intrapleurales de ratones atímicos. Se observará que la consecuencia de este tipo de implantación del tumor es una diseminación metastásica similar a la observada en el ser humano, y lleva a la muerte de los animales. La figura 39 muestra que la administración de los anticuerpos 225 y 7C10 solos, permite observar una ganancia comparable y significativa en la supervivencia. De manera sorprendente, la coadministración de estos dos anticuerpos aumenta en una manera considerable la supervivencia de los animales, sugiriendo que este tratamiento podría tener un impacto sobre la diseminación metastásica de las células tumorales.

Ejemplo 23

7C10 y 7H2HM inhiben la fosforilación de la tirosina de la cadena β del IGF-IR y del IRS-1

Se cultivan células MCF7 durante 24 horas a $5 \cdot 10^4$ células/cm² (placas de 75 cm², COSTAR) en 20 ml de RPMI sin rojo de fenol, adicionado con 5 mM de glutamina, penicilina/estreptomicina (respectivamente, 100 U/100 μ g/ml) y 10% de suero de ternera fetal. Después de tres lavados en PBS, las células se incubaron durante 12 horas en medio (RPMI) sin rojo de fenol, desprovisto de suero de ternera fetal, y se añadió 5 mM de glutamina, penicilina/estreptomicina, 0,5 μ g/ml de albúmina de suero bovino (Sigma A-8022) y 5 μ g/ml de transferrina (Sigma T8158).

Para la activación, las células se incubaron primero a 37°C durante 2 minutos con anticuerpos de bloqueo (10 μ g/ml), y después se añadió IGF-I (Sigma 13769, 50 ng/ml) por otros dos minutos más. La reacción se detuvo mediante la aspiración del medio de incubación, y las placas se colocaron sobre hielo. Las células se solubilizaron mediante adición de 0,5 ml de tampón de lisis (50 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1% de Nonidet P40, 0,5% de desoxicolato de sodio), se añadieron inhibidores de proteasa (1 tableta por 50 ml, Boehringer, Ref.: 1697 498) e inhibidores de fosfatasa (Calbiochem., Ref.: 524625 (1/100)). Las células se raederaron, y la suspensión se recuperó y se colocó sobre un agitador a 4°C durante 1,5 horas. Las disoluciones se centrifugaron a 12.000 rpm durante diez minutos (4°C), y las concentraciones de proteína de los sobrenadantes se cuantificaron mediante BCA.

Se mezclaron 500 μ g de proteínas del lisado celular con el anti-IGF-IR (Santa Cruz, Ref.: sc-713) para inmunoprecipitación, y se incubaron sobre el agitador a 4°C durante 1,5 horas. Los inmunoprecipitados se recuperaron mediante la adición de proteína A-agarosa (Boehringer, Ref.: 1 134 515), y se incubaron durante la noche sobre el agitador a 4°C. Para la inmunoprecipitación de IRS-1, se usaron anticuerpos anti-IRS-1 acoplados con perlas de agarosa (Santa Cruz, Ref.: 559Ac). Las perlas de agarosa se lavaron dos veces con 1 ml de tampón de lisis, dos veces con un tampón de lavado 1 (50 mM de Tris-HCl, pH 7,5; 500 mM de NaCl; 0,1% de Nonidet P40; 0,05% de desoxicolato de sodio (Boehringer, Ref.: 1 332 597)), adicionado de inhibidores de proteasa e inhibidores de fosfatasa, y una vez con un tampón de lavado 2 (50 mM de Tris-HCl; 0,1% de Nonidet P40; 0,05% de desoxicolato de sodio (Boehringer, Ref.: 1 332 597)), y se añadieron inhibidores de proteasa e inhibidores de fosfatasa 1/100). Los inmunoprecipitados se resuspendieron en un tampón de Laemmli, y se calentaron a 100°C durante 5 minutos. Los sobrenadantes se analizaron mediante electroforesis sobre gel de poliacrilamida-SDS (8% de Novex EC6015). Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, seguido de una inmunotransferencia con anticuerpos anti-fosfotirosina conjugados con HRP (Upstate Biotechnology 4G10) o anti-cadena beta del IGF-IR o anti-IRS-1 (Santa Cruz, Ref.: sc 8038), seguido de un anticuerpo anti-conejo conjugado con HRP. Las impresiones se revelaron mediante quimioluminiscencia (Amersham, RPN 2209), seguida de una autorradiografía sobre películas Kodak X-mat AR.

La figura 40A representa células MCF7 no estimuladas (0) o estimuladas con IGF-1 (50 ng/ml) solo (0+IGF-1), o combinadas con anticuerpos anti-IGF-IR monoclonales o humanizados (10 μ g/ml) 7C10, 1H7, 7H2HM. Los anticuerpos 9G4 o hIgG1 son inmunoglobulinas murinas o de humano de isotipo IgG1 usados como control negativo del experimento. Las cadenas beta del IGF-IR fueron inmunoprecipitadas y transferidas con anticuerpos anti-tirosina fosforilada. Los resultados obtenidos muestran que los anticuerpos 7C10, 1H7 y 7H2HM anti-IGF-IR monoclonales o humanizados, inhiben la fosforilación de la tirosina de la cadena beta del IGF-IR.

La figura 40B representa células MCF7 no estimuladas (0) o estimuladas con IGF-1 (50 ng/ml) solo (0+IGF-1), o combinadas con anticuerpos anti-IGF-IR monoclonales o humanizados (10 μ g/ml) 7C10, 1H7, 7H2HM. Como se describió anteriormente, los anticuerpos 9G4 o hIgG1 son inmunoglobulinas murinas o de humano de isotipo IgG1 usadas como control negativo del experimento. El IRS-1 fue inmunoprecipitado y transferido con anticuerpos anti-tirosina fosforilada. Los resultados obtenidos muestran que los anticuerpos monoclonales 7C10, 7H2HM y 1H7 inhiben la fosforilación de la tirosina del IRS-1.

Ejemplo 24

7C10 y 7H2HM inducen la incorporación del IGF-IR

- 5 Se suspendieron células MCF7 y A549 a 1.10^7 células/ml en PBS con 10% de suero de ternera fetal (tampón FACS). Se incubaron 1.10^6 células durante 30 minutos a 37°C con $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ de anticuerpos monoclonales (7C10, 7G3, 9G4) o $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ para 7H2HM. Después del lavado, las células se marcaron a 4°C durante 30 minutos con un anti-IGF-IR biotinilado (anticuerpo monoclonal 12B1), y se incubaron finalmente a 4°C durante 30 minutos con un conjugado de estreptavidina 488 alexa Fluor®. Las células se analizaron usando FACScan (Becton-Dickinson, Enembogegem, Bélgica) con el programa Cellquest después de la eliminación de los restos.

- 15 La figura 41 muestra las células A549 sin coloración (primer valor máximo), las células A549 incubadas con 7C10 o 7H2HM (segundo valor máximo) y las células A549 incubadas con una IgG1 irrelevante de ratón o rata (tercer valor máximo). Se observa una disminución doble de la expresión de superficie del IGF-IR por las células, cuando las células han sido incubadas previamente con 7C10 o 7H2HM.

Ejemplo 25

7C10 y 7H2HM inducen la degradación del IGF-IR

- 20 Se cultivaron células MCF-7 durante 24 horas a 10.10^4 células/cm² (75 cm^2 , Costar) en 15 ml de medio completo. Después, los cultivos se lavaron tres veces con PBS y se incubaron durante 12 horas con un medio que carece de suero. Después, las células se incubaron con cicloheximida a $25\text{ }\mu\text{g/ml}$ sola, o con $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo monoclonal 7C10, 9G4, 7G3 o del IGF-I (50 ng/ml). En ciertos experimentos, antes de la incubación con los anticuerpos monoclonales, las células se trataron durante 1 hora a 37°C con MG-132 ($10\text{ }\mu\text{M}$, Calbiochem 474791) para inhibir las actividades de proteasoma. Después de la incubación, las células se lavaron y se solubilizaron mediante la adición de un tampón de lisis. Se analizaron $20\text{ }\mu\text{g}$ de proteínas mediante electroforesis sobre 8% de gel de poliacrilamida de SDS, y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, seguido de un inmunotransferencia anti-cadena beta del IGF-IR, tal como se describió anteriormente.

- 30 El análisis mediante transferencia Western (figura 42A) de la integridad del IGF-IR, muestra que 7C10 y 7H2HM inducen la degradación del receptor, mientras que el ligando natural no causa ninguna degradación de este último. No se observa ninguna degradación del receptor con el 9G4, un anticuerpo irrelevante usado como isotipo de control. La figura 42B demuestra, que la degradación se inhibe mediante un inhibidor de proteasoma MG132 (período de incubación de 2 horas).

Se obtuvieron resultados comparables con el anticuerpo humanizado 7H2HM (figura 42C).

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo aislado, o uno de sus fragmentos funcionales, siendo dicho anticuerpo o dichos fragmentos funcionales capaces de unirse al receptor del factor de crecimiento 1 tipo insulina IGF-IR de humano, **caracterizado** porque:
 - dicho anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende los tres CDR de secuencia SEC ID nº 8, 10 y 12, y una cadena ligera que comprende los tres CDR de secuencia SEC ID nº 2, 4 y 6; y
 - dicho fragmento funcional se selecciona de entre los fragmentos Fv, Fab, (Fab')₂, Fab', scFv, scFv-Fc y los dianticuerpos, y porque dicho fragmento comprende los tres CDR de secuencia SEC ID nº 8, 10 y 12, y los tres CDR de secuencia SEC ID nº 2, 4 y 6.
2. Hibridoma murino según la reivindicación 1, depositado en el CNCM, Instituto Pasteur, París, el 19 de septiembre de 2001, bajo el número 1-2717.
3. Anticuerpo **caracterizado** porque está segregado por el hibridoma según la reivindicación 2.
4. Anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque dicho anticuerpo comprende una cadena ligera de secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 54, y porque comprende una cadena pesada de secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 69.
5. Anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, según la reivindicación 4, **caracterizado** porque dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico y comprende además las regiones constantes de cadena ligera y cadena pesada derivadas de un anticuerpo de una especie heteróloga al ratón.
6. Anticuerpo quimérico, o uno de sus fragmentos funcionales, según la reivindicación 5, **caracterizado** porque dicha especie heteróloga es el ser humano.
7. Anticuerpo quimérico, o uno de sus fragmentos funcionales, según la reivindicación 6, **caracterizado** porque las regiones constantes de cadena ligera y cadena pesada derivadas de un anticuerpo humano son, respectivamente, la región kappa y gamma-1, gamma-2 o gamma-4.
8. Anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado y comprende una cadena ligera y/o una cadena pesada, en la cual los segmentos del esqueleto FR1 a FR4 de dicha cadena ligera y/o cadena pesada, derivan respectivamente de segmentos del esqueleto FR1 a FR4 de cadena ligera y/o cadena pesada de anticuerpo humano.
9. Anticuerpo humanizado o uno de sus fragmentos funcionales, según la reivindicación 8, **caracterizado** porque dicho anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 61 ó 65, y porque comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 75, 79 u 83.
10. Anticuerpo humanizado, o uno de sus fragmentos funcionales, según la reivindicación 9, **caracterizado** porque dicho anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 65, y porque comprende una cadena pesada de secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 83.
11. Ácido nucleico aislado, **caracterizado** porque se selecciona entre los siguientes ácidos nucleicos:
 - a) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica un anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 y 3 a 10;
 - b) un ácido nucleico complementario de un ácido nucleico tal como se define en a); y
 - c) un ácido nucleico de por lo menos 18 nucleótidos capaz de hibridar bajo condiciones muy restrictivas, con al menos una de las CDR de secuencia SEC ID nº 1, 3, 5, 7, 9 u 11.
12. Vector que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 11.
13. Célula hospedante que comprende un vector según la reivindicación 12.
14. Procedimiento para la producción de un anticuerpo, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:
 - a) cultivar en un medio y condiciones de cultivo adecuados una célula según la reivindicación 13; y
 - b) recuperar dichos anticuerpos así producidos a partir del medio de cultivo o dichas células cultivadas.
15. Anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, según una de las reivindicaciones 1 y 3 a 10, como un medicamento.

ES 2 283 759 T3

16. Composición que comprende, a título de principio activo, un compuesto que consiste de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, según una de las reivindicaciones 1, 3 a 10 y 15.

17. Composición según la reivindicación 16, como un medicamento.

18. Uso de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, según una de las reivindicaciones 1, 3 a 10 y 15, o de una composición según una de las reivindicaciones 16 y 17, para la preparación de un medicamento destinado para la prevención y/o para el tratamiento de cáncer.

19. Uso según la reivindicación 18, **caracterizado** porque dicho cáncer se elige entre el cáncer de la próstata, las osteosarcomas, el cáncer del pulmón y el cáncer de mama.

20. Uso según una de las reivindicaciones 18 ó 19, **caracterizado** porque dicho cáncer consiste en el cáncer de la próstata dependiente de andrógeno.

21. Método de diagnóstico *in vitro* de enfermedades inducidas por una sobreexpresión o una subexpresión del receptor IGF-IR, a partir de una muestra biológica en la cual se sospecha la presencia anormal del receptor IGF-IR, **caracterizado** porque dicha muestra biológica se pone en contacto con un anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 y 3 a 10, pudiendo ser, llegado el caso, marcado.

22. Kit o juego para llevar a cabo un método de diagnóstico de enfermedades inducidas por una sobreexpresión o una subexpresión del receptor IGF-IR, o para llevar a cabo un procedimiento para la detección y/o la cuantificación de una sobreexpresión o de una subexpresión del receptor IGF-IR en una muestra biológica, preferentemente una sobreexpresión de dicho receptor, **caracterizado** porque dicho kit o juego comprende los siguientes elementos:

- a) un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, según una de las reivindicaciones 1 y 3 a 10;
- b) opcionalmente, los reactivos para la formación del medio favorable para la reacción inmunológica;
- c) opcionalmente, los reactivos que permitan la demostración de complejos de IGF-IR/anticuerpo producidos mediante la reacción inmunológica.

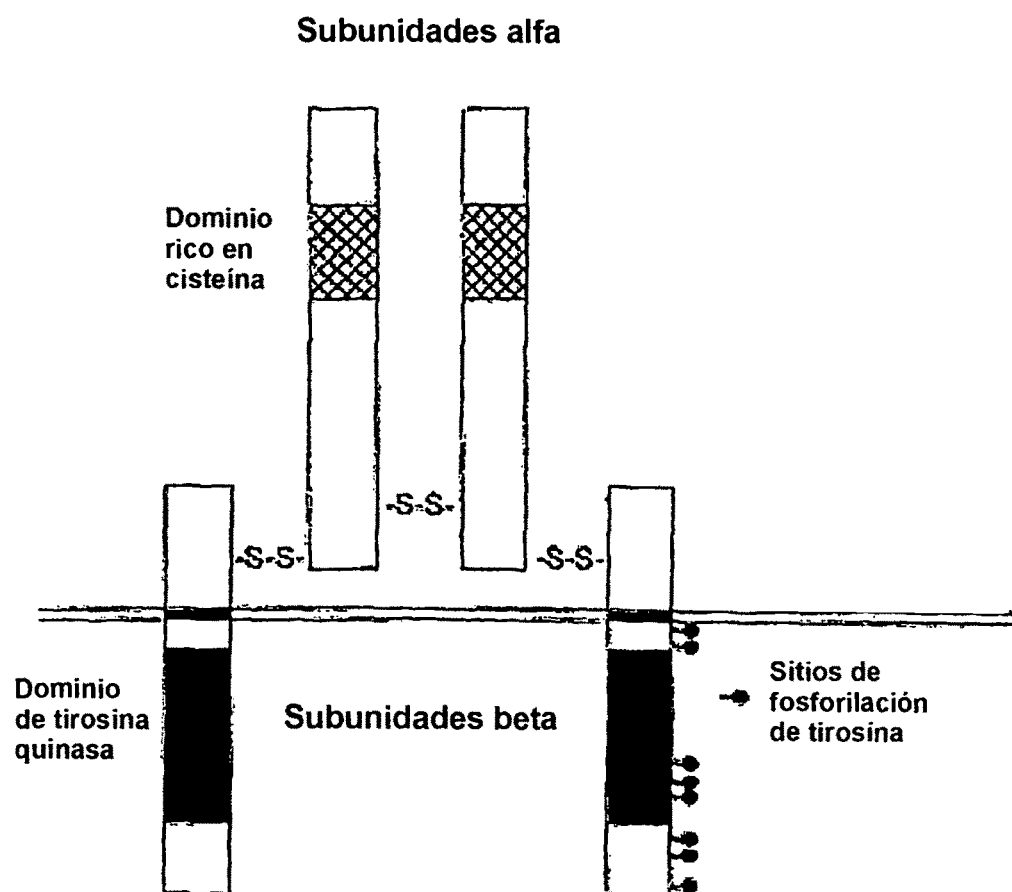


FIGURA 1

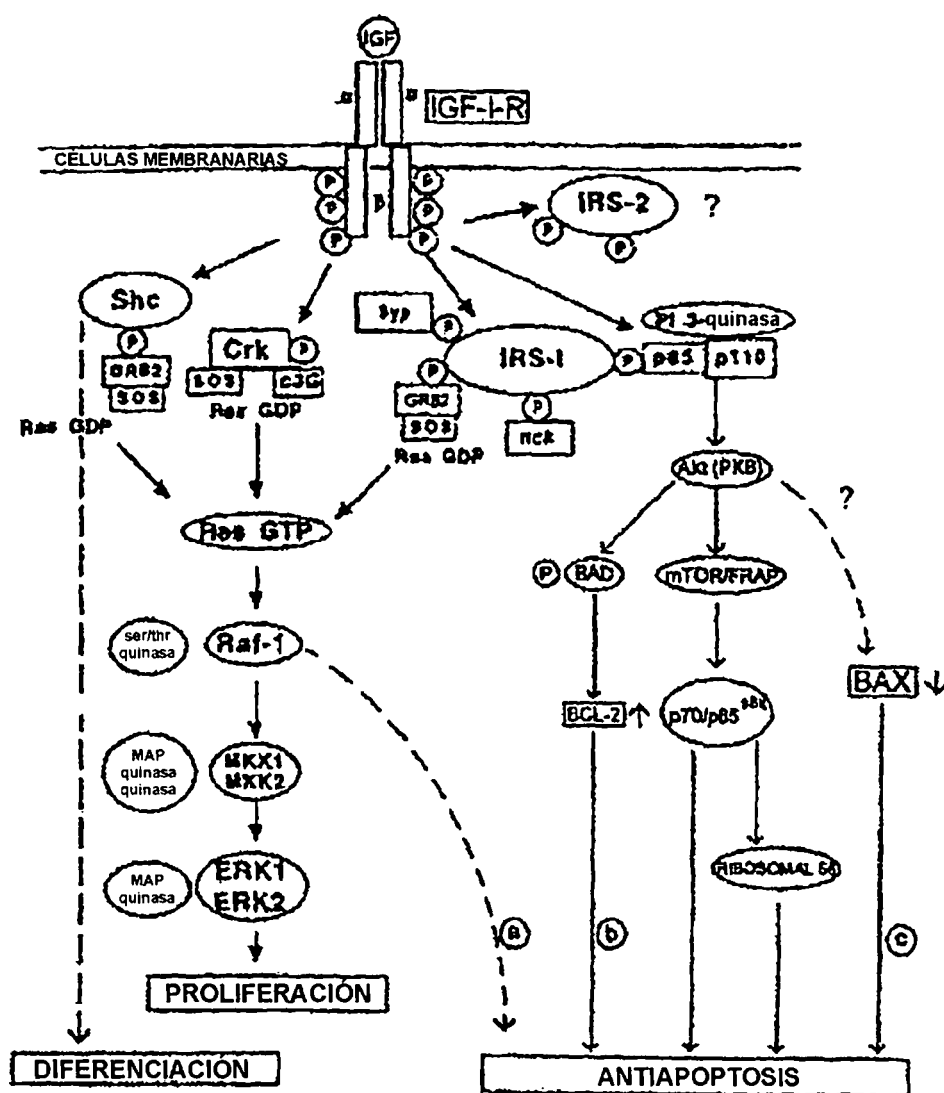


FIGURA 2

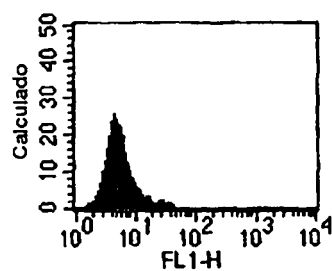


FIGURA 3A

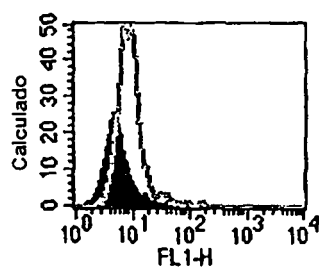


FIGURA 3B

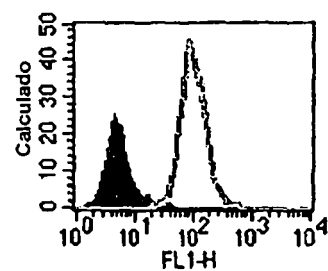
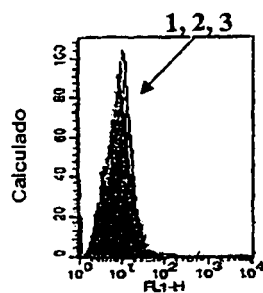
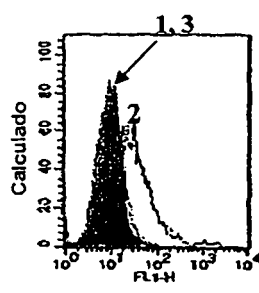


FIGURA 3C



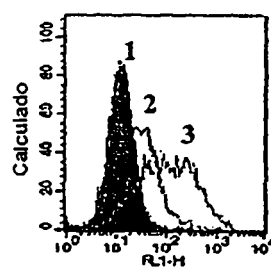
Células no transfectadas

FIGURA 4A



Células IGF-IR+

FIGURA 4B



Células IR+

FIGURA 4C

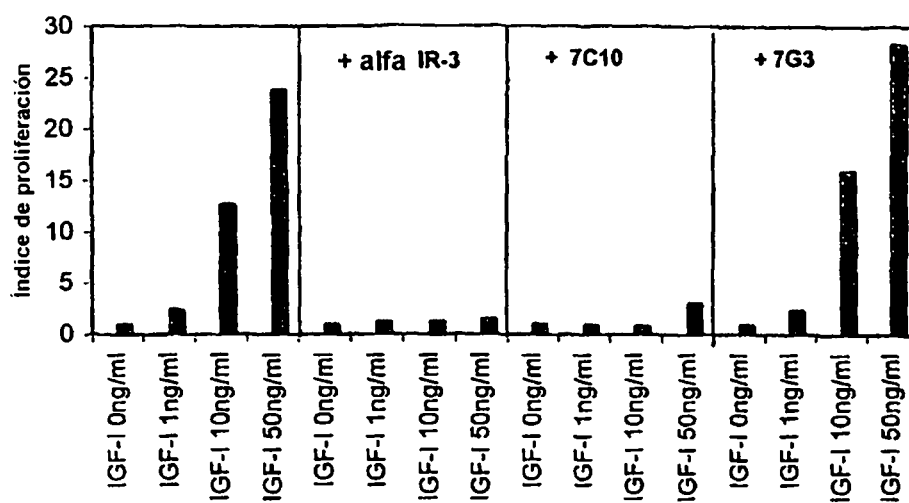


FIGURA 5

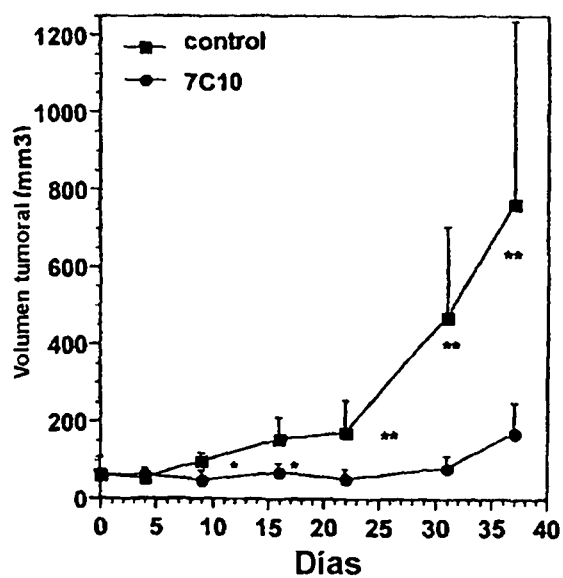


FIGURA 6A

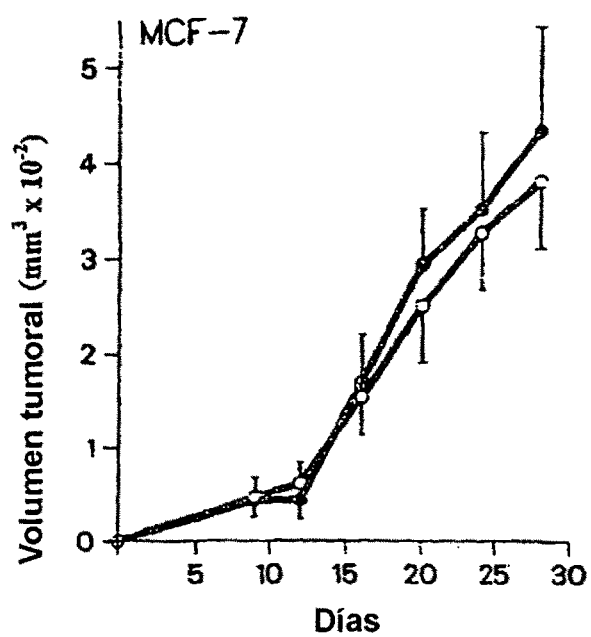


FIGURA 6B

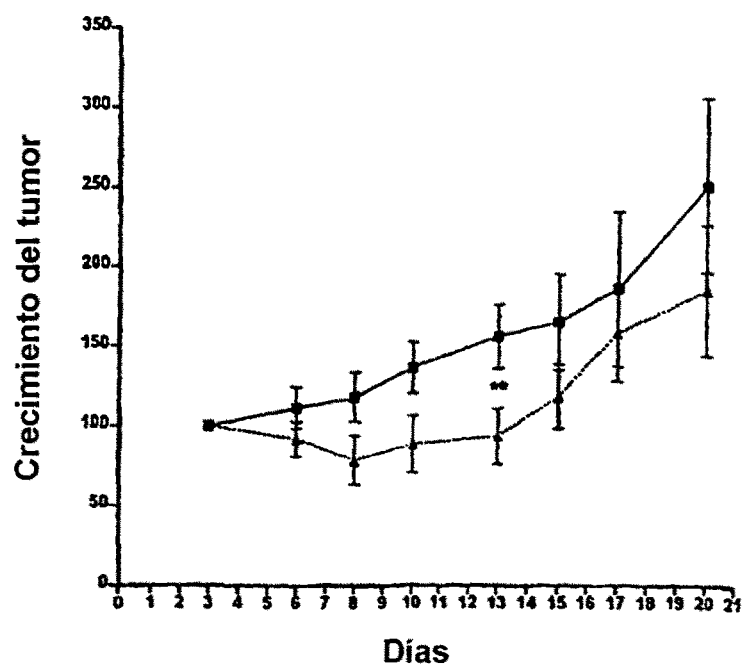


FIGURA 6C

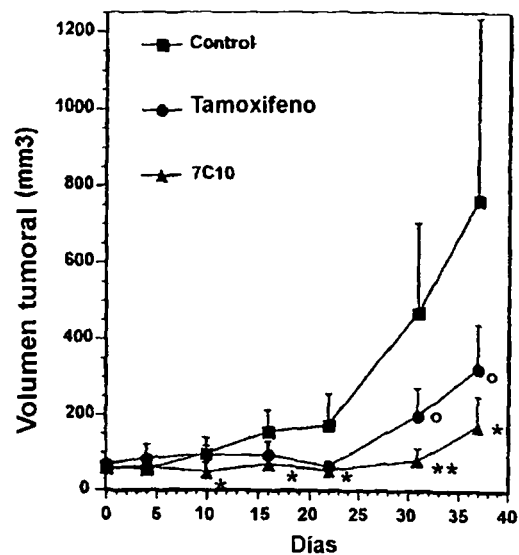


FIGURA 7

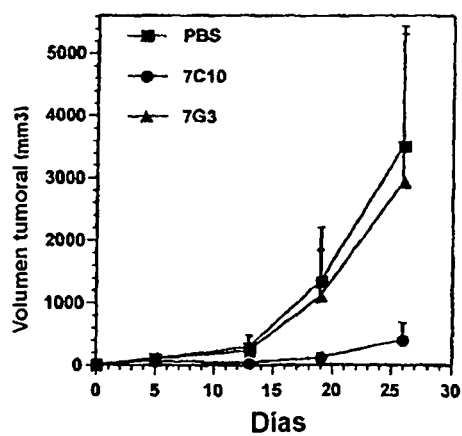


FIGURA 8A

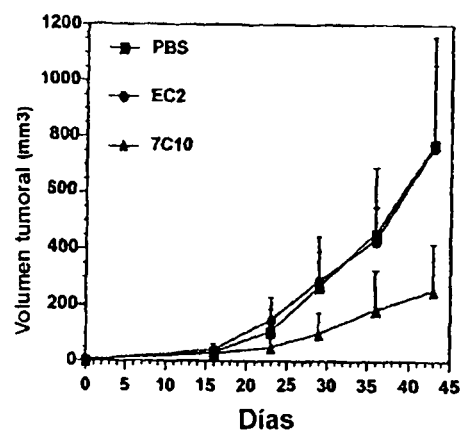


FIGURA 8B

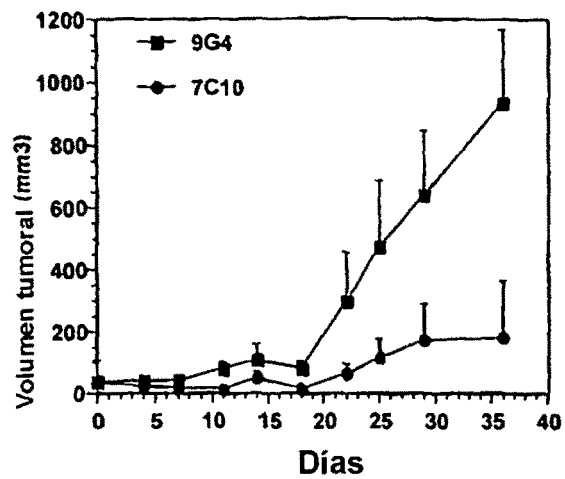


FIGURA 8C

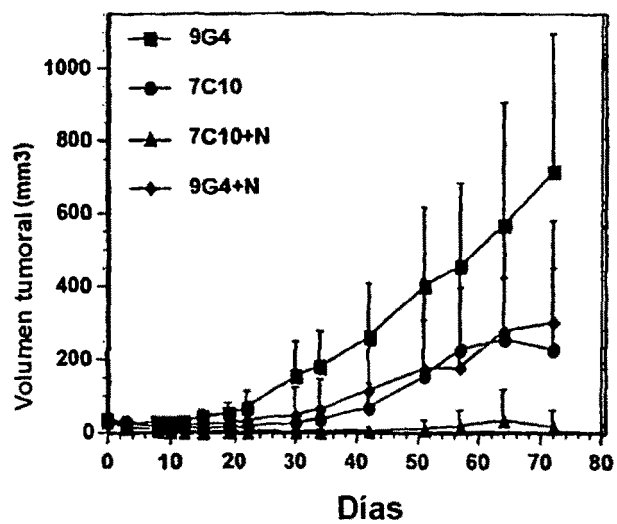


FIGURA 9

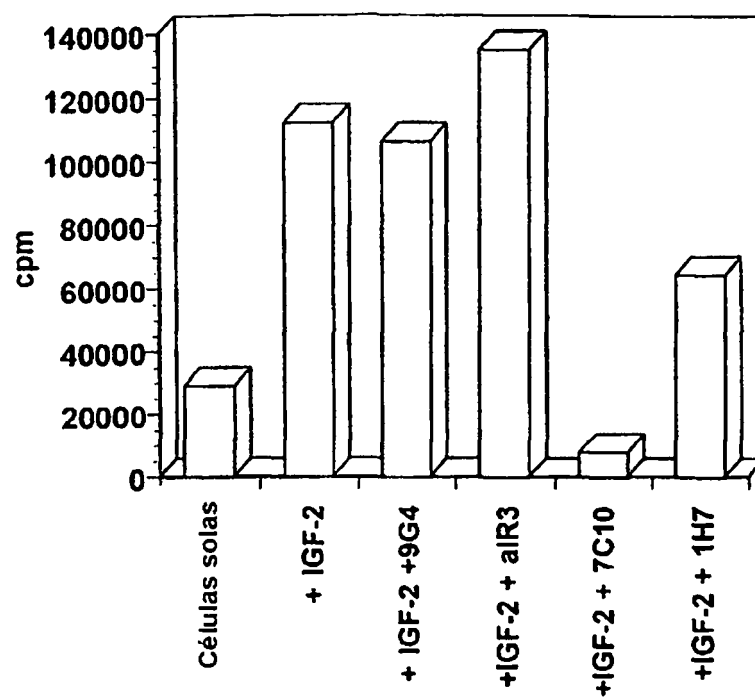


FIGURA 10

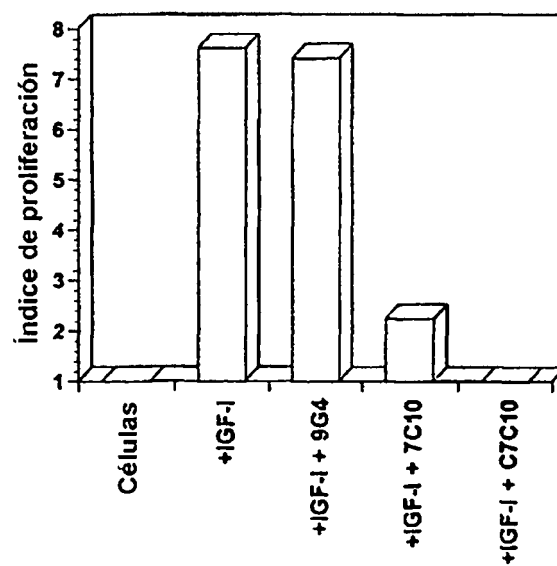


FIGURA 11

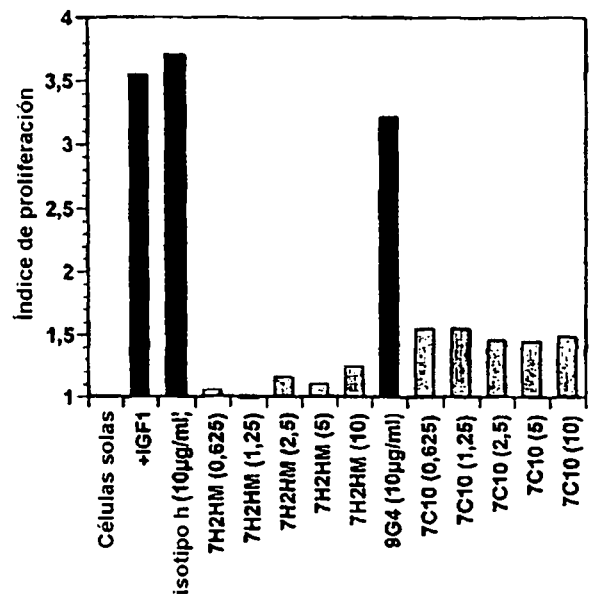


FIGURA 12

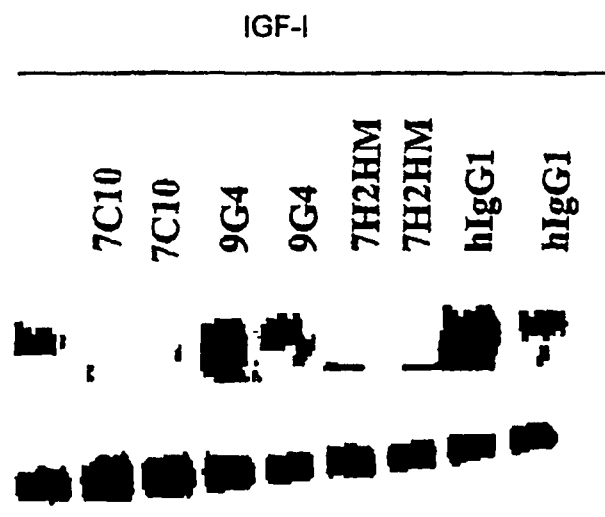


FIGURA 13

```

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCAGAAGTGAT
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
TACTTCAACGGACAATCCGACAACCACGACTACAAGACCTAAGGACGAAGGTCTTCACTA
ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT
      oligo MKV-1      L M F W I P A S R S D -
                        extremo 3' del péptido líder
GTTTTGATGACCCAAATTCCTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATC
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
CAAACTACTGGGTTTAAGGTGAGAGGGACGGACAGTCAGAACCTCTAGTTCGGAGGTAG

V L M T Q I P L S L P V S L G D Q A S I -

TCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTACAATGGTAC
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
AGAACGTCTAGATCAGTCTCGTAACATGTATCATTACCTTTGTGGATAAATGTTACCATG

S C R S S Q S I V H S N G N T Y L Q W Y -
                        CDR 1
CTGCAGAAACCAGGTCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGACTTTAT
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
GACGTCTTTGGTCCAGTCAGAGGTTTCGAGGACTAGATGTTTCAAAGGTTGGCTGAAATA

L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R L Y -
                        CDR 2
GGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CCCCAGGGTCTGTCCAAGTCACCGTCACCTAGTCCCTGTCTAAAGTGTGAGTTCTAGTCG

G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S -

AGCGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGTGG
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
TCGCACCTCCGACTCCTAGACCCTCAAATAATGACGAAAGTTCCAAGTGTACAAGGCACC

S V E A E D L G V Y Y C F Q G S H V P W -
                        CDR 3
                        GG
ACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
TGCAAGCCACCTCCGTGGTTCGACCTTTAGTTTGCCCGACTACGACGTGGTTGACATAGG

T F G G G T K L E I K

      MKC oligo
      TAGAAGGGTGGTAGGTCA
      ATCTTCCCACCATCCAGT
421 -----+-----+-----+-----+ 438
      TAGAAGGGTGGTAGGTCA

```

FIGURA 14

```

      ATGATGGTGTAAAGTCTTCTGTACCTCTTGACAGCCATTCTGGTATCCTGTCTGATGTA
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
      TACTACCACAATTCAGAAGACATGGACAACCTGTCGGTAAGGACCATAGGACAGACTACAT
MHV-12 ATGATGGTGTAAAGTCTTCTGTACCT
MHV-8  ATGAGAGTGCATGATTCTTTTGTG
              L L T A I P G I L S D V -
              extremo 3' del péptido líder
      CAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTCGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCTCTCACCTGC
61  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
      GTCGAAGTCCTCAGTCTGGACCGGAGCACTTTGGAAGAGTCAGAGACAGAGAGTGGACG

      Q L Q E S G P G L V K P S Q S L S L T C -

      TCTGTCACCGGCTACTCCATCACCGGTGGTTATTTATGGAAGTGGATCCGGCAGTTTCCA
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
      AGACAGTGGCCGATGAGGTAGTGGCCACCAATAAATACCTTGACCTAGGCCCGTCAAAGGT

      S V T G Y S I T G G Y L W N W I R Q F P -
                        CDR 1
      GGAAACAAACTGGAGTGGATGGGCTACATAAGCTACGACGGTACCAATAACTACAAACCA
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
      CCTTTGTTTGACCTCACCTACCCGATGTATTGATGCTGCCATGGTTATTGATGTTTGGT

      G N K L E W M G Y I S Y D G T N N Y K P -
                        CDR 2
      TCTCTCAAAGATCGAATCTCCATCACTCGTGACACATCTAAGAACCAGTTTTTCTGAAG
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
      AGAGAGTTTCTAGCTTAGAGGTAGTGAGCACTGTGTAGATTCTTGGTCAAAAAGGACTTC

      S L K D R I S I T R D T S K N Q F F L K -

      TTGAATTCTGTGACTAATGAAGACACAGCTACATATTACTGTGCAAGATACGGTAGGGTC
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
      AACTTAAGACACTGATTACTTCTGTGTCGATGTATAATGACACGTTCTATGCCATCCCAG

      L N S V T N E D T A T Y Y C A R Y G R V -
                        CDR 3
                        GGG
      TTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
      AAGAAACTGATGACCCCGGTTCCGTGGTGAGAGTGTGAGAGGAGTCGGTTTTGCTGTGGG

      F F D Y W G Q G T T L T V S S
      oligo MHC-1
      GGTAGACAGATAGGTGAC
      CCATCTGTCTATCCACTG
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 438
      GGTAGACAGATAGGTGAC

```

FIGURA 15

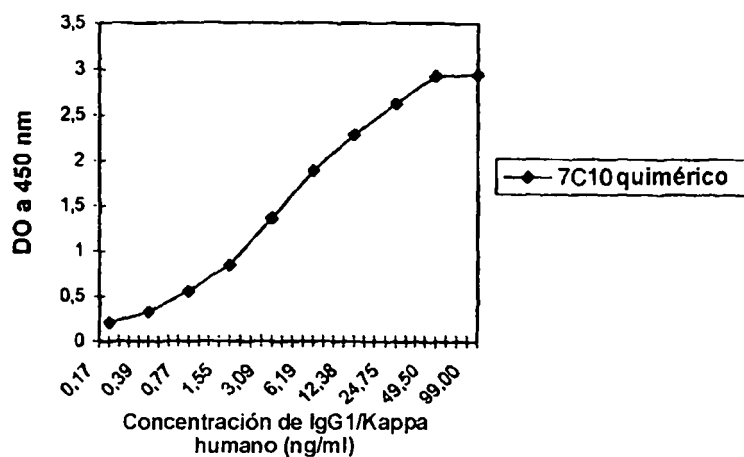


FIGURA 16

	3	7	CDR 1
Ratón 7C10 VL	DVLMTQIPLSLPVSLGDQASISC		RSSQSIVHSNGNTYLQ
DRB1-4.3	T.....		E
C94-5B11' CL	T.....		E
Ratón de Kabat sgll	..V...T.....		L.....E

	CDR 2
Ratón 7C10 VL	WYLQKPGQSPKLLIY KVSNRLY GVPDRFSGSGSGTDFTL
DRB1-4.3	FS.....
C94-5B11' CL	FS.....
Ratón de Kabat sgll	FS.....

	77	CDR 3
Ratón 7C10 VL	KISSVEAEDLGVIYC	FQGSHPWT FGGGTKLEIK
DRB1-4.3	...R.....	F...S...D..
C94-5B11' CL	...R.....	
Ratón de Kabat sgll	...R.....	...T...Y.....

FIGURA 17

		CDR 1
Ratón 7C10 VL	DVLMTQIPLSLPVSLGDQASISC	<u>RSSQSIVHSNGNTYLO</u>
GM607	.IV...S.....TP.EP.....	LL....YN..D
DPK15/A19	.IV...S.....TP.EP.....	LL....YN..D
Kabat sgII hu	.IV...S.....TP.EP.....	LL..D.XX..X
	CDR 2	
Ratón 7C10 VL	WYLQKPGQSPKLLIY	<u>KVSNRLY</u> GVPDRFSGSGSGTDFTLK
GM607	Q....	LG...AS
DPK15/A19	Q....	LG...AS
Kabat sgII hu	Q....	L...AS
	CDR 3	
Ratón 7C10 VL	ISSVEAEDLGVIYC	<u>FGGSHVPWT</u> FGGGTKLEIK
GM607	..R.....V.....	M.ALQT.Q. ..Q...V...
DPK15/A19	..R.....V.....	M.ALQT.
Kabat sgII hu	..R.....V.....	M.ALQX.R. ..Q...V...

FIGURA 18

		CDR 1
Ratón 7C10 VL	DVLMTQIPLSLPVSLGDQASISC	<u>RSSQSIVHSNGNTYLO</u>
GM 607	.IV...S.....TP.EP.....	LL....YN..D
7C10 VL humanizado 1	..V...S.....TP.EP.....	
7C10 VL humanizado 2	.IV...S.....TP.EP.....	
	CDR 2	
Ratón 7C10 VL	WYLQKPGQSPKLLIY	<u>KVSNRLY</u> GVPDRFSGSGSGTDFTL
GM 607	Q....	LG...AS
7C10 VL humanizado 1	Q....	
7C10 VL humanizado 2	Q....	
	CDR 3	
Ratón 7C19 VL	KISSVEAEDLGVIYC	<u>FGGSHVPWT</u> FGGGTKLEIK
GM 607	...R.....V.....	M.ALQT.Q. ..Q...V...
7C10 VL humanizado 1	...R.....V.....	Q...V...
7C10 VL humanizado 2	...R.....V.....	Q...V...

FIGURA 19

MluI
 |
 GTCAGAACGCGTGCCGCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGG
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 CAGTCTTGCGCACGGCGGTGGTACTTCAACGGACAATCCGACAACCACGACTACAAGACC

 M K L P V R L L V L M F W -
 Péptido líder
 TTTCCTGCTTCCAGCAGTGATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACC
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 AAAGGACGAAGGTCGTCACTACAACACTACTGAGTCAGAGGTGAGAGGGACGGGCAGTGG
 2
 F P A S S S D V V M T Q S P L S L P V T -
 CCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGA
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 GGACCTCTCGGCCGGAGGTAGAGGACGTCCAGATCAGTCTCGTAACATGTATCATTACCT
 CDR 1
 P G E P A S I S C R S S Q S I V H S N G -
 KpnI
 |
 AACACCTATTTGCAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTAT
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 TTGTGGATAAACGTTACCATGGACGTCTTCGGTCCCGTCAGAGGTGTCGAGGACTAGATA
 N T Y L Q W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y -
 AAAGTTTCTAATCGGCTTTATGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACA
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 TTCAAAGATTAGCCGAAATACCCAGGGACTGTCCAAGTCACCGTCACCTAGTCCGTGT
 CDR 2
 K V S N R L Y G V P D R F S G S G S G T -
 GATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCTTT
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 CTAAAATGTGACTTTTAGTCGTCTCACCTCCGACTCCTACAACCCCAAATAATGACGAAA
 D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F -
 CAAGGTTACATGTTCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTGAG
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 GTTCCAAGTGTTACAAGGCACCTGCAAGCCGGTTCCTGGTTCCACCTTTAGTTTGCACCTC
 CDR 3
 Q G S H V P W T F G Q G T K V E I K
 BamHI
 |
 TGGATCCTCTGCG
 421 -----+----- 433
 ACCTAGGAGACGC

FIGURA 20

MluI
 |
 GTCAGAACGCGTGCCGCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGG
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 CAGTCTTGCGCACGGCGGTGGTACTTCAACGGACAATCCGACAACCACGACTACAAGACC

M K L P V R L L V L M F W -
 Péptido líder
 TTTCTGCTTCCAGCAGTGATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACC
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 AAAGGACGAAGGTCGTCACTACAACACTACTGAGTCAGAGGTGAGAGGGACGGGCAGTGG

2
 F P A S S S D I V M T Q S P L S L P V T -
 CCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGA
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 GGACCTCTCGGCCGGAGGTAGAGGACGTCCAGATCAGTCTCGTAACATGTATCATTACCT

CDR 1
 P G E P A S I S C R S S Q S I V H S N G -
 KpnI
 |
 AACACCTATTTGCAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTAT
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 TTGTGGATAAACGTTACCATGGACGTCTTCGGTCCCGTCAGAGGTGTCGAGGACTAGATA

N T Y L Q W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y -
 AAAGTTTCTAATCGGCTTTATGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACA
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 TTTCAAAGATTAGCCGAAATACCCCAGGGACTGTCCAAGTCACCGTCACCTAGTCCGTGT

CDR 2
 K V S N R L Y G V P D R F S G S G S G T -
 GATTTTACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCTTT
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 CTAAAATGTGACTTTTAGTCGTCTCACCTCCGACTCCTACAACCCCAAATAATGACGAAA

D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F -
 CAAGGTTACATGTTCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTGAG
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 GTTCCAAGTGTACAAGGCACCTGCAAGCCGGTTCCTGGTTCCACCTTTAGTTTGCACCTC

CDR 3
 Q G S H V P W T F G Q G T K V E I K
 BamHI
 |
 TGGATCCTCTGCG
 421 -----+-----+-----+-----+-----+ 433
 ACCTAGGAGACGC

FIGURA 21

	17	27	CDR 1
7C10 VH	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSIT		GGYLWN WIRQ
AN03'CL			S..Y:
Kabat sgI(A)	<u>E</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>D</u> ...		S..WN. ...

	CDR 2
7C10 VH	FPGNKLEWMG YISYDGTNNYKPSLKD RISITRDTSKNQFFL
AN03'CL	N...N...N...N
Kabat sgI(A)	S.STY.N...S <u>Y</u> ..

	84	CDR 3
7C10 VH	KLNSVTNEDTATYYCAR YGRV-FFDY WGQGTTLTVSS	
AN03'CL	 <u>T</u> E.YGY	
Kabat sgI(A)	<u>Q</u> <u>T</u> G.YGYG <u>V</u>	

FIGURA 22

	Rch 1	30	CDR 1	Rch 2
Ratón 7C10 VH	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSIT		GGYLWN WIRQ	
Kabat sgII humano	Q.....T.....T.S. <u>G</u> . <u>VS</u>		SYWS	
VH FUR1'CL humano	Q.....ET.....T.S....S		S..Y.S	
Línea germinal humana	Q.....ET.....T.S....S		S..Y.S	

	Rch 2	48	CDR 2	67	71	Rch 3
Ratón 7C10 VH	FPGNKLEWMG YISYDGTNNYKPSLKD		RISITRDTSKNQFFL			
Kabat sgII humano	P..KG...I. R.Y.S.STX.N....S		.VT.SV.....S.			
VH FUR1'CL humano	P..KG...I. SMFHS.SSY.N....S		.VT.SV.....S.			
Línea germinal humana	P..KG...I. S.YHS.STY.N....S		.VT.SV.....S.			

	Rch 3	CDR 3	Rch 4
Ratón 7C10 VH	KLNSVTNEDTATYYCAR YGRVFFDY		WGQGTTLTVSS
Kabat sgII humano	..S...AA...V..... ELPGGYDV		LV....
VH FUR1'CL humano	Q.R ...AA...V..... GRYCSSTSCNWFDP		LV....
Línea germinal humana	..S...AA...V.....		

FIGURA 23

		30	CDR 1	48
Ratón 7C10 VH	DVQLQESGPGLVKPSQSLTCSVTGYSIT	<u>GGYLWN</u>	WIRQFPGNKLEWMG	
Línea germinal humana	Q.....ET.....T.S.... <u>S</u>	S..Y.G	P..KG... <u>I</u>	
VH humanizado 1	Q.....ET.....T.S....		P..KG....	
VH humanizado 2	Q.....ET.....T.S....		P..KG...I.	
VH humanizado 3	Q.....ET.....T.S.... <u>S</u>		P..KG...I.	
	CDR 2	67	71	
Ratón 7C10 VH	<u>YISYDGTNNYKPSLKD</u>	RISITRDTSKNQFFLKLNSVTNEDTATYYCAR		
Línea germinal humana	S.FHS.SSY.N....S	<u>VT.SV</u>S...S...AA...V.....		
VH humanizado 1		<u>T.S</u>S...S...AA...V.....		
VH humanizado 2		<u>VT.S</u>S...S...AA...V.....		
VH humanizado 3		<u>VT.SV</u>S...S...AA...V.....		
	CDR 3			
Ratón 7C10 VH	<u>YGRVFFDY</u>	WGQGTTLTVSS		
Línea germinal humana				
VH humanizado 1		LV....		
VH humanizado 2		LV....		
VH humanizado 3		LV....		

FIGURA 24

ES 2 283 759 T3

MluI

```

      |
GTCAGAACGCGTGCCGCCACCATGAAAGTGTTGAGTCTGTTGTACCTCTTGACAGCCATT
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
CAGTCTTGCGCACGGCGGTGGTACTTTACAACTCAGACAACATGGAGAACTGTCGGTAA

      M K V L S L L Y L L T A I -
      Péptido líder
CCTGGTATCCTGTCTCAGGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
GGACCATAGGACAGAGTCCACGTCAAGTCCTCAGCCCGGGTCCTGACCACTTCGGAAGC

P G I L S Q V Q L Q E S G P G L V K P S -
GAGACCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTTACTCCATCACCGGTGGTTATTTATGG
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
CTCTGGGACAGGGAGTGGACGTGACAGAGACCAATGAGGTAGTGGCCACCAATAAATACC

      30          CDR 1
E T L S L T C T V S G Y S I T G G Y L W -
AACTGGATACGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCAGCTACGAC
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
TTGACCTATGCCGTCGGGGGTCCCTTCCCTGACCTCACCTACCCCATATAGTCGATGCTG

      48
N W I R Q P P G K G L E W M G Y I S Y D -
      KpnI
      |
GGTACCAATAACTACAAACCCTCCCTCAAGGATCGAATCACCATATCACGTGACACGTCC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CCATGGTTATTGATGTTTGGGAGGGAGTTCCTAGCTTAGTGGTATAGTGCAGTGTGCAGG

      CDR 2          67          71
G T N N Y K P S L K D R I T I S R D T S -
AAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACTGCAGTGTATTAC
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
TTCTTGGTCAAGAGGGACTTCGACTCGAGACACTGGCGACGCCTGTGACGTACACATAATG

K N Q F S L R L S S V T A A D T A V Y Y -
TGTCGAGATACGGTAGGGTCTTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
ACACGCTCTATGCCATCCCAGAAGAACTGATGACCCCGGTCCCTTGGGACCAGTGGCAG

      CDR 3
C A R Y G R V F F D Y W G Q G T L V T V -

      BamHI
      |
TCCTCAGGTGAGTGGATCCTCTGCG
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 445
AGGAGTCCACTCACCTAGGAGACGC

S S -

```

FIGURA 25

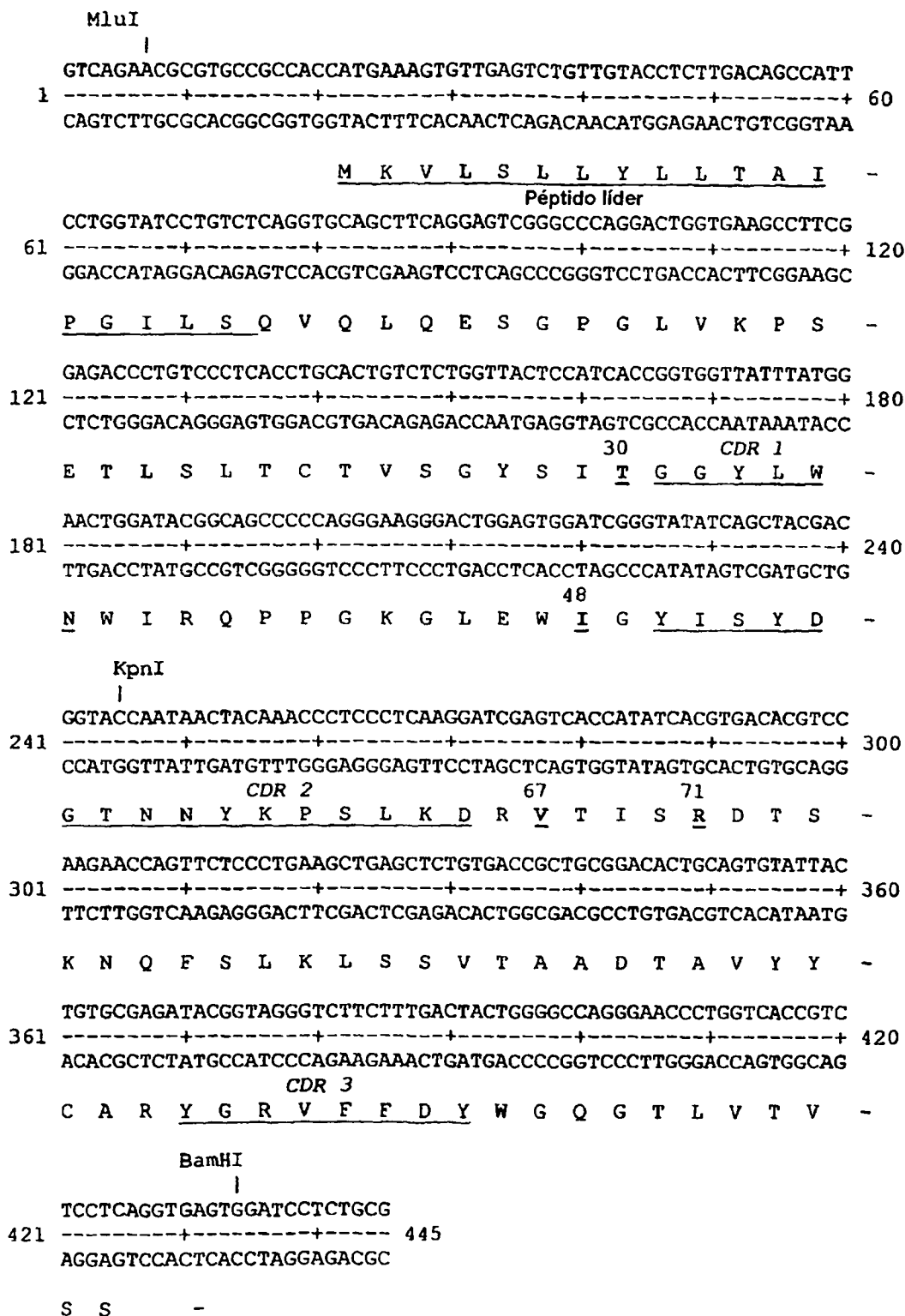


FIGURA 26

ES 2 283 759 T3

MluI
 |
 GTCAGAACGCGTGCCGCCACCATGAAAGTGTTGAGTCTGTTGTACCTCTTGACAGCCATT
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
 CAGTCTTGCACGCGGCGGTGGTACTTTCACTCACTCAGACAACATGGAGAAGTGTGCGGTAA

 M K V L S L L Y L L T A I -
 Péptido líder
 CCTGGTATCCTGTCTCAGGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
 GGACCATAGGACAGAGTCCACGTGCAAGTCCTCAGCCCGGGTCTGACCACTTCGGAAGC

 P G I L S Q V Q L Q E S G P G L V K P S -
 GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTTACTCCATCAGCGGTGGTTATTTATGG
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
 CTCTGGGACAGGGAGTGGACGTGACAGAGACCAATGAGGTAGTCGCCACCAATAAATACC
 30 CDR 1
 E T L S L T C T V S G Y S I S G G Y L W -
 AACTGGATACGGCAGCCCCAGGGAAGGACTGGAGTGGATCGGGTATATCAGCTACGAC
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
 TTGACCTATGCCGTCGGGGGTCCCTTCCCTGACCTACCTAGCCCATATAGTCGATGCTG
 48
N W I R Q P P G K G L E W I G Y I S Y D -
 KpnI
 |
 GGTACCAATAACTACAAACCCTCCCTCAAGGATCGAGTCACCATATCAGTGGACACGTCC
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
 CCATGGTTATTGATGTTTGGGAGGGAGTTCCCTAGCTCAGTGGTATAGTCACCTGTGCAGG
 CDR 2 67 71
 G T N N Y K P S L K D R V T I S V D T S -
 AAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACTGCAGTGTATTAC
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
 TTCTTGGTCAAGAGGACTTCGACTCGAGACACTGGCGACGCCTGTGACGTCACATAATG

 K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y -
 TGTGCGAGATACGGTAGGGTCTTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
 ACACGCTCTATGCCATCCCAGAAGAACTGATGACCCCGGTCCCTTGGGACCACTGGCAG
 CDR 3
 C A R Y G R V F F D Y W G Q G T L V T V -

 BamHI
 |
 TCCTCAGGTGAGTGGATCCTCTGCG
 421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 445
 AGGAGTCCACTCACCTAGGAGACGC

 S S

FIGURA 27

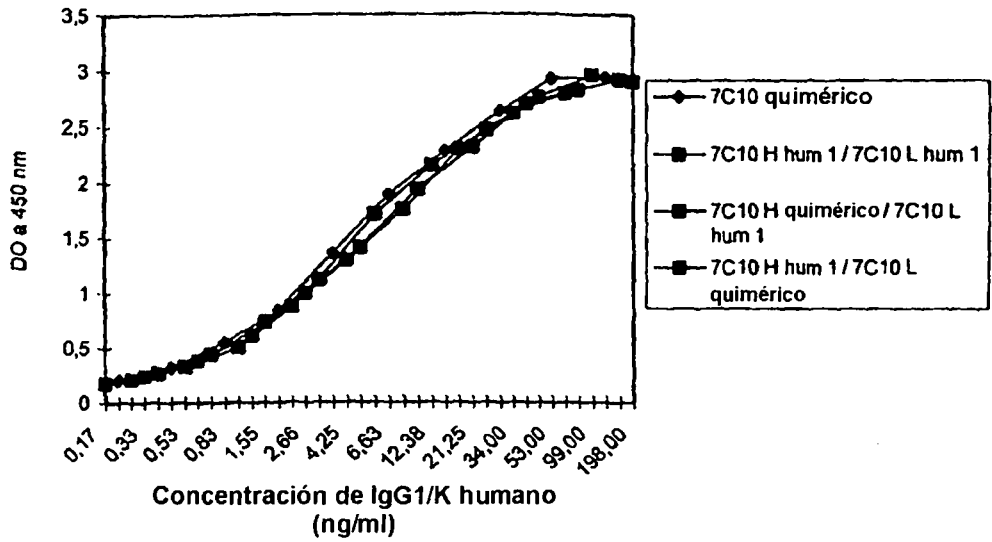


FIGURA 28

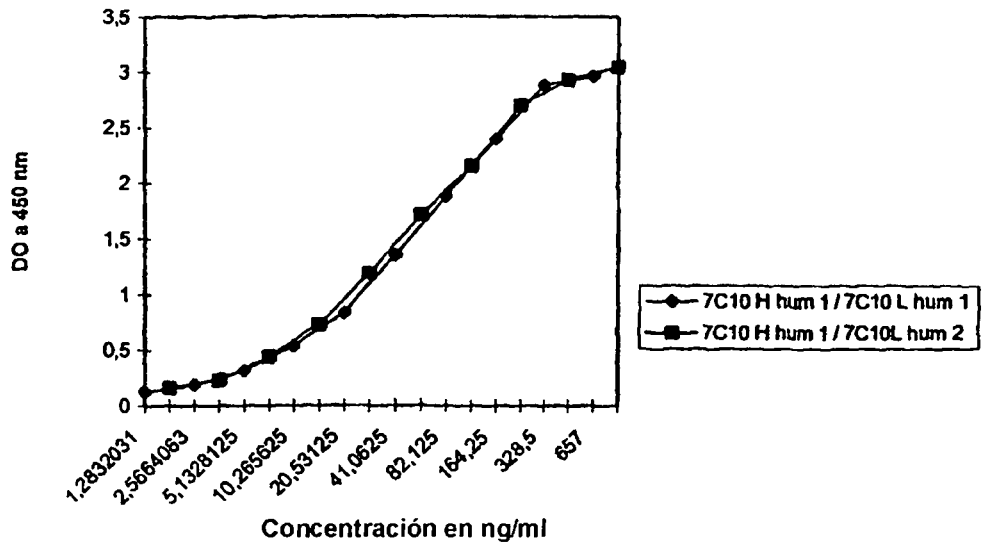


FIGURA 29

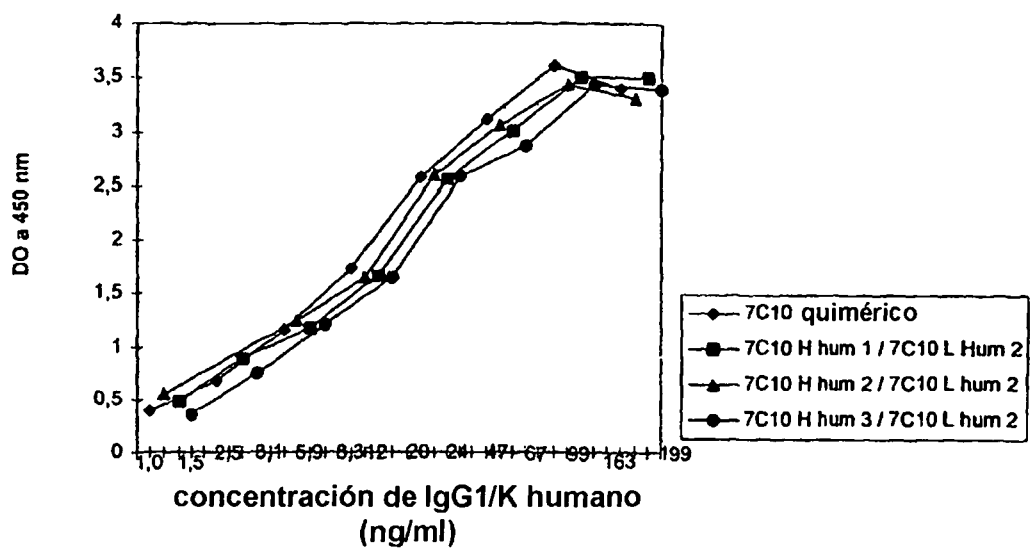


FIGURA 30

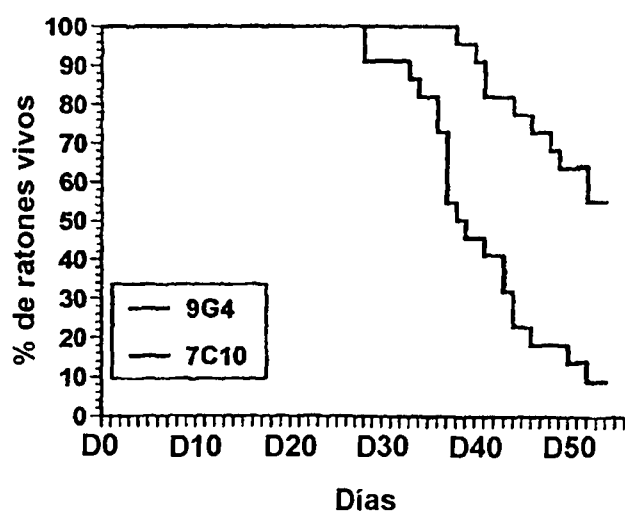


FIGURA 31

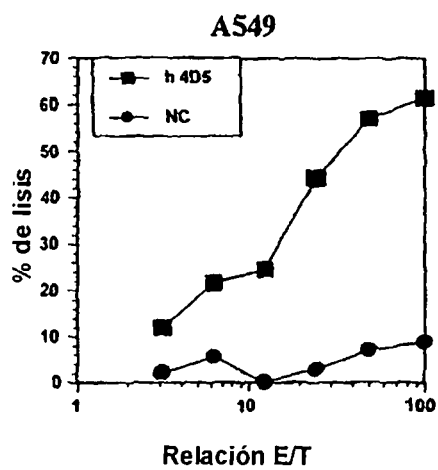


FIGURA 32A

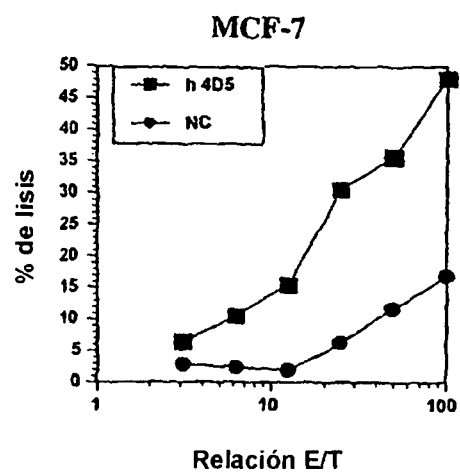


FIGURA 32B

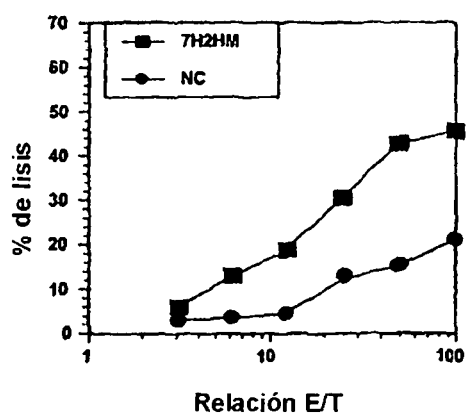


FIGURA 32C

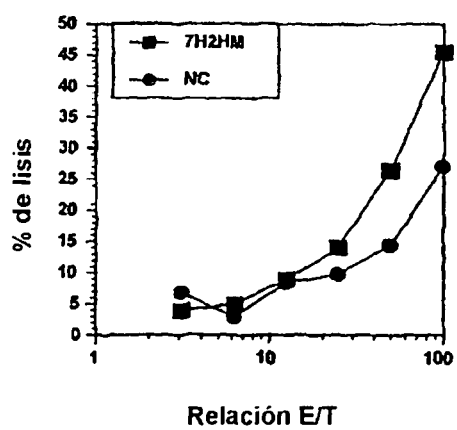


FIGURA 32D

- IGF1

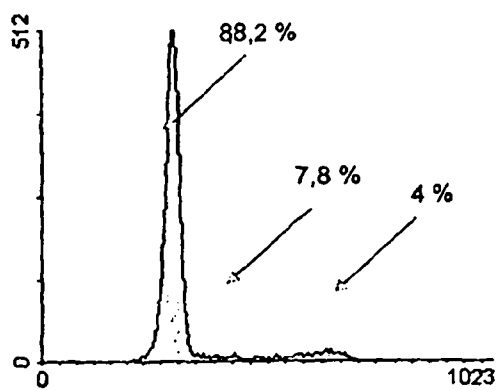


FIGURA 33A

+ IGF1 (50 ng/ml)

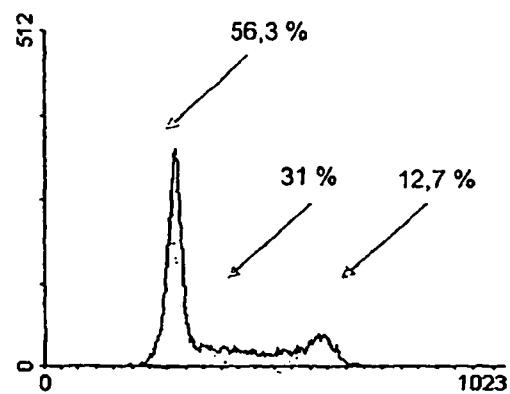


FIGURA 33B

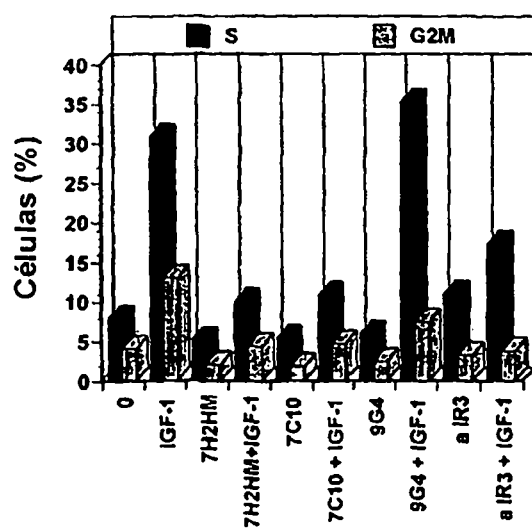


FIGURA 33C

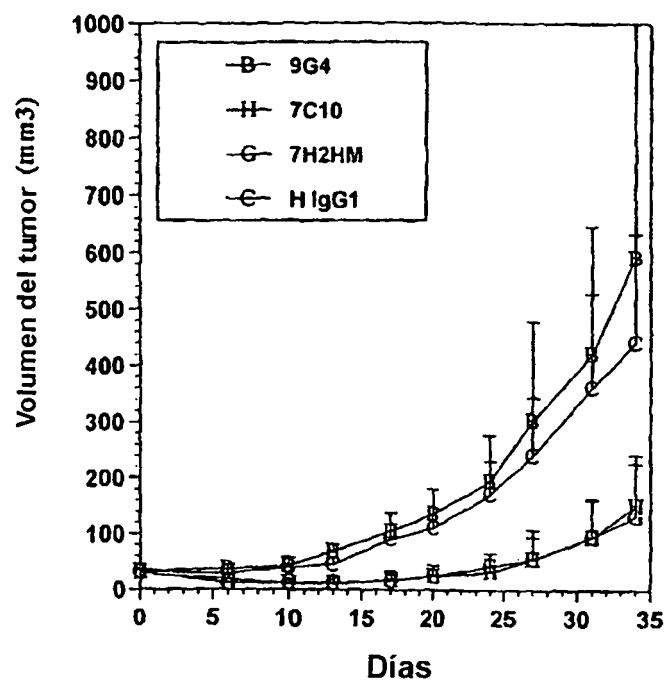


FIGURA 34A

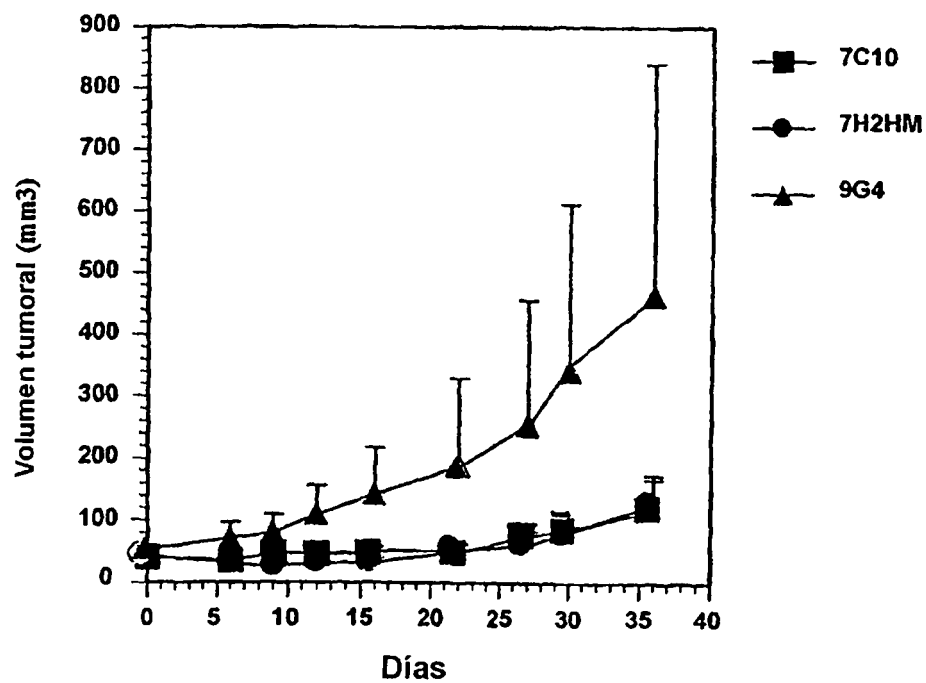


FIGURA 34B

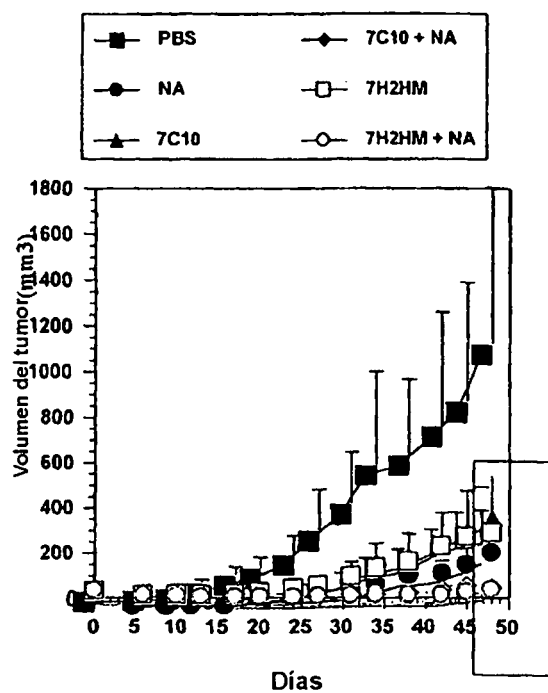


FIGURA 35A

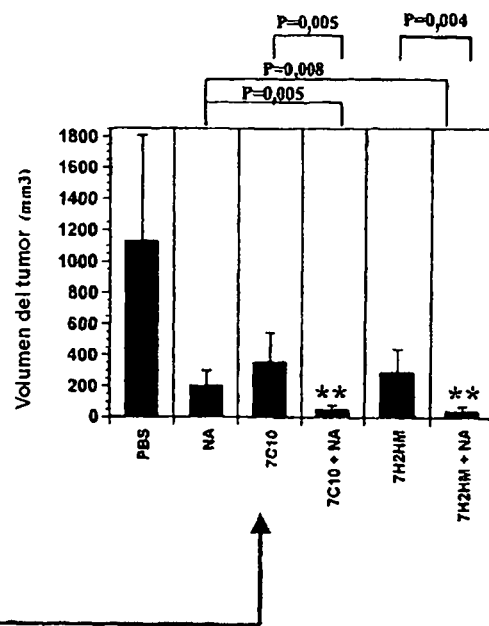


FIGURA 35B

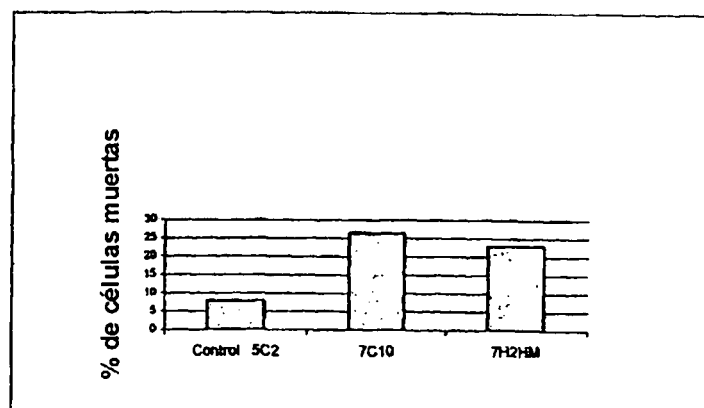


FIGURA 36

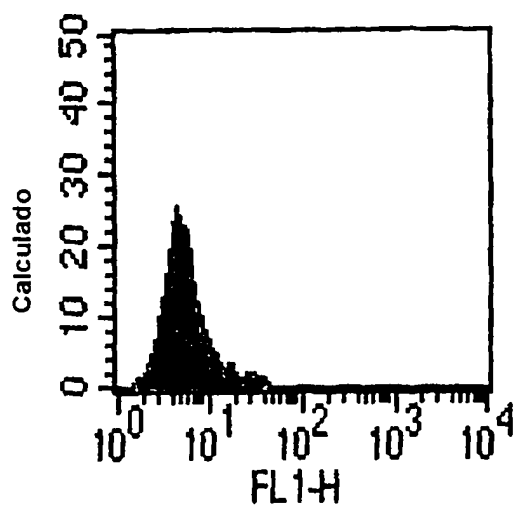


FIGURA 37A

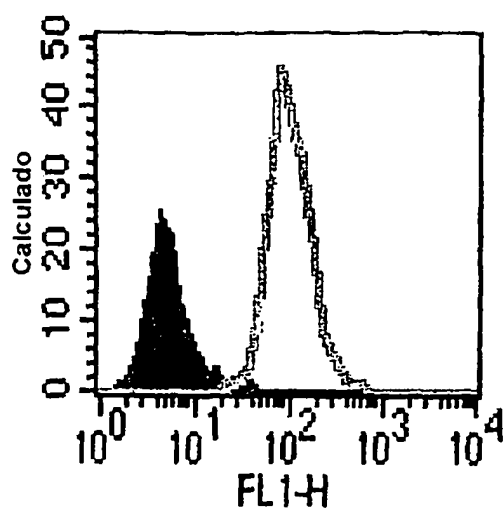


FIGURA 37B

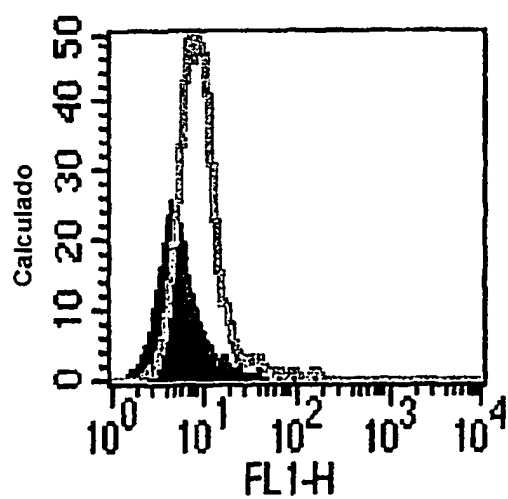


FIGURA 37C

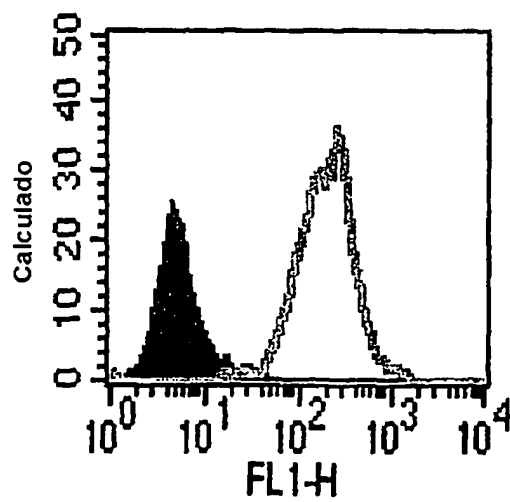


FIGURA 37D

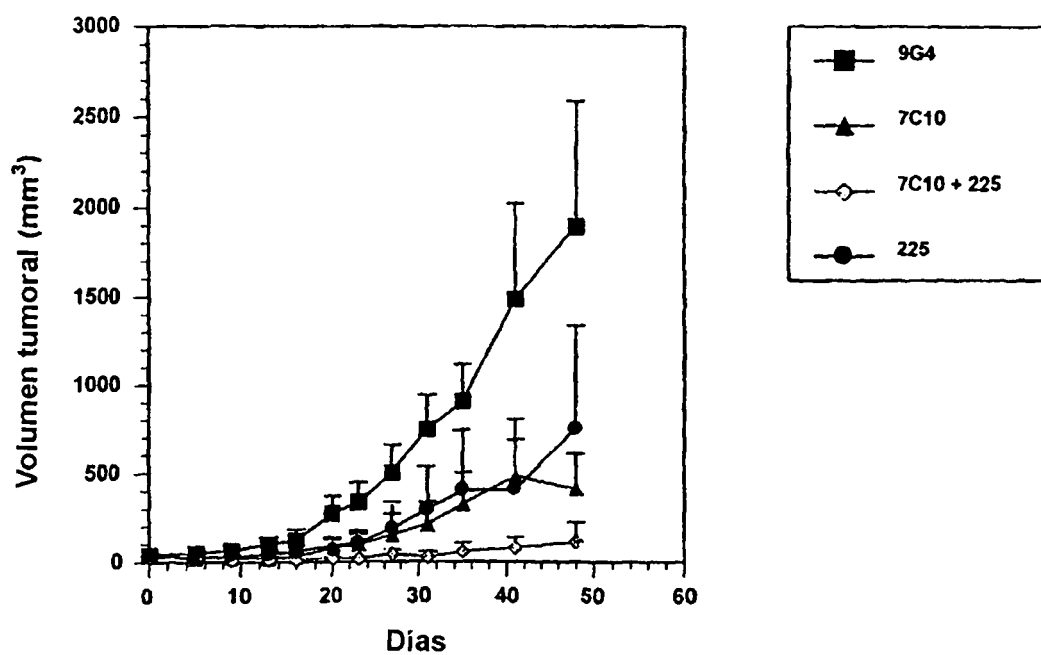


FIGURA 38

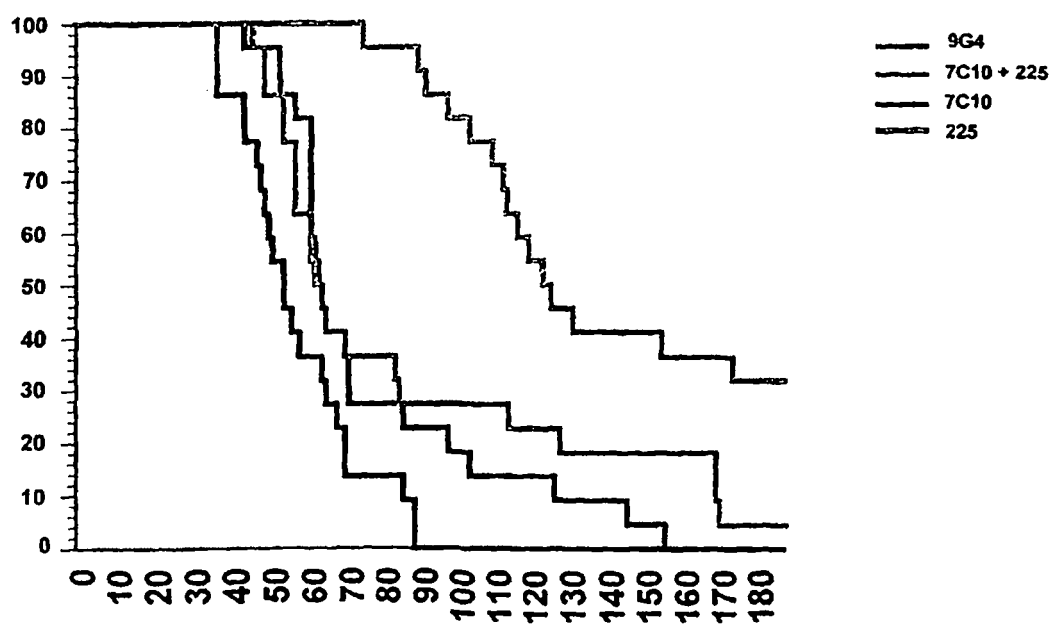


FIGURA 39

FIGURA 40A

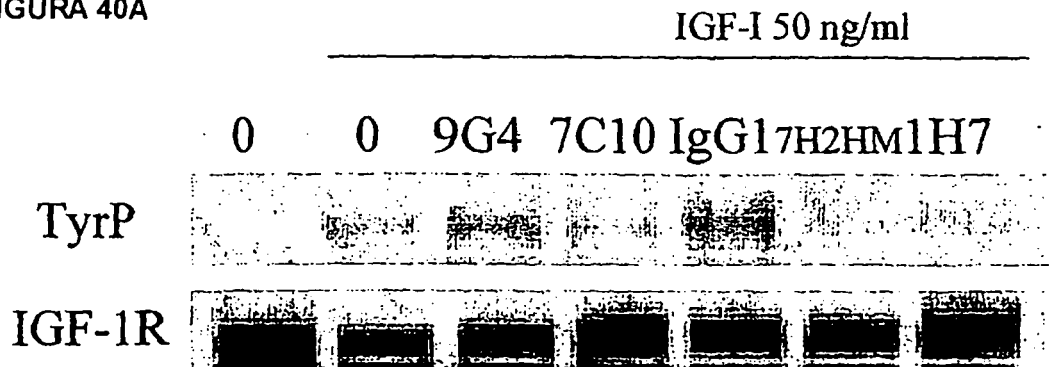


FIGURA 40B

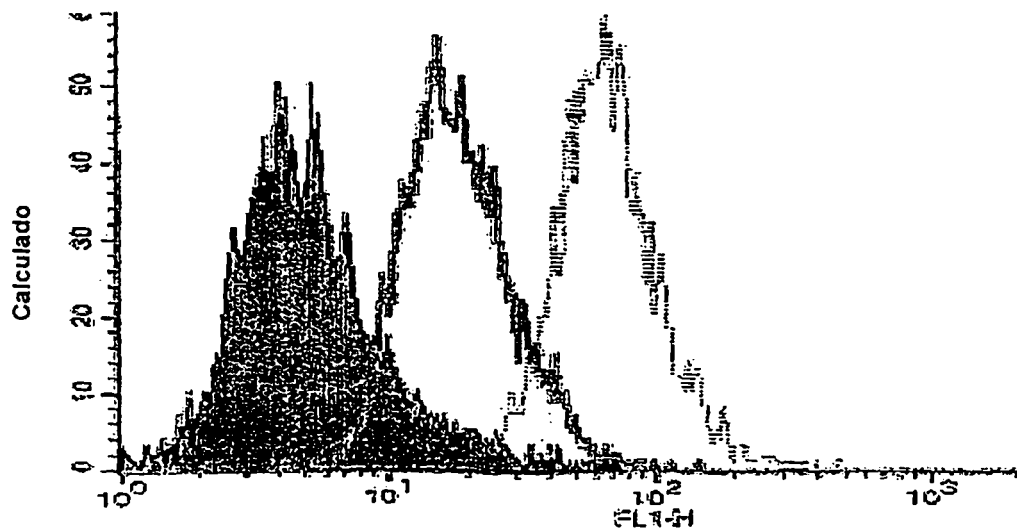
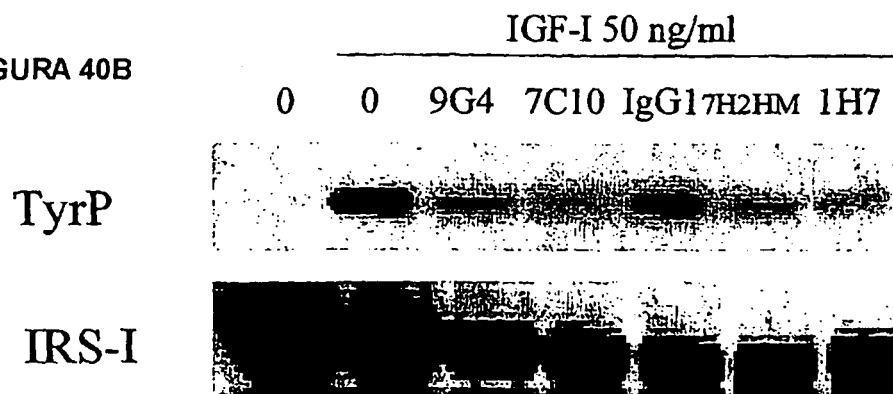


FIGURA 41

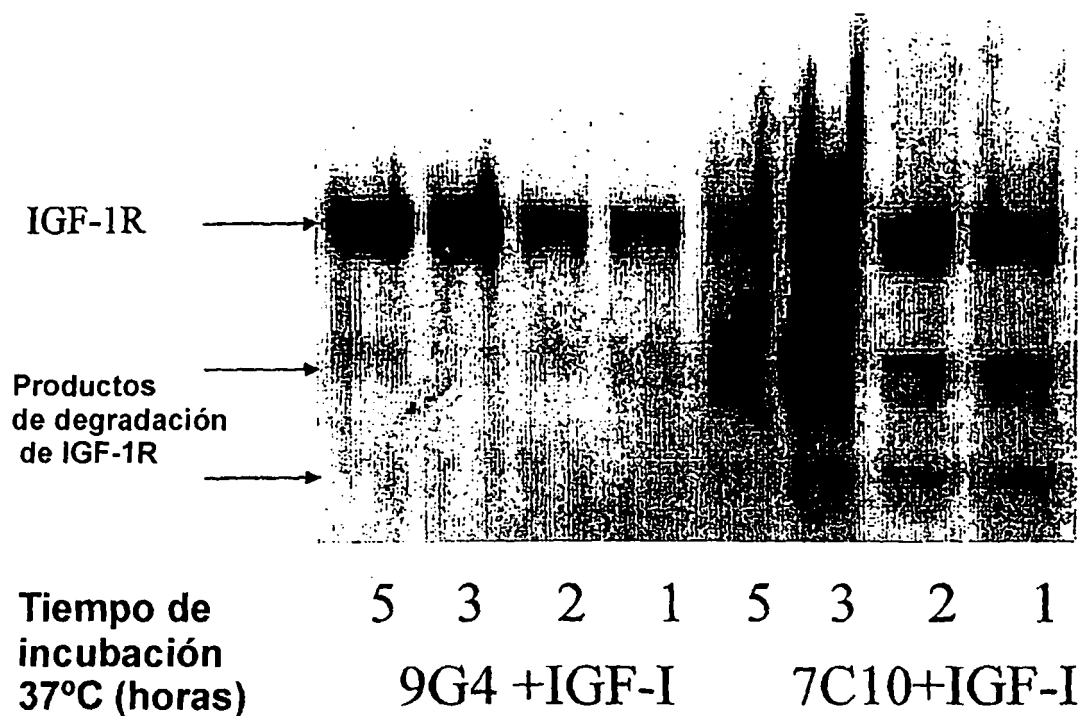


FIGURA 42A

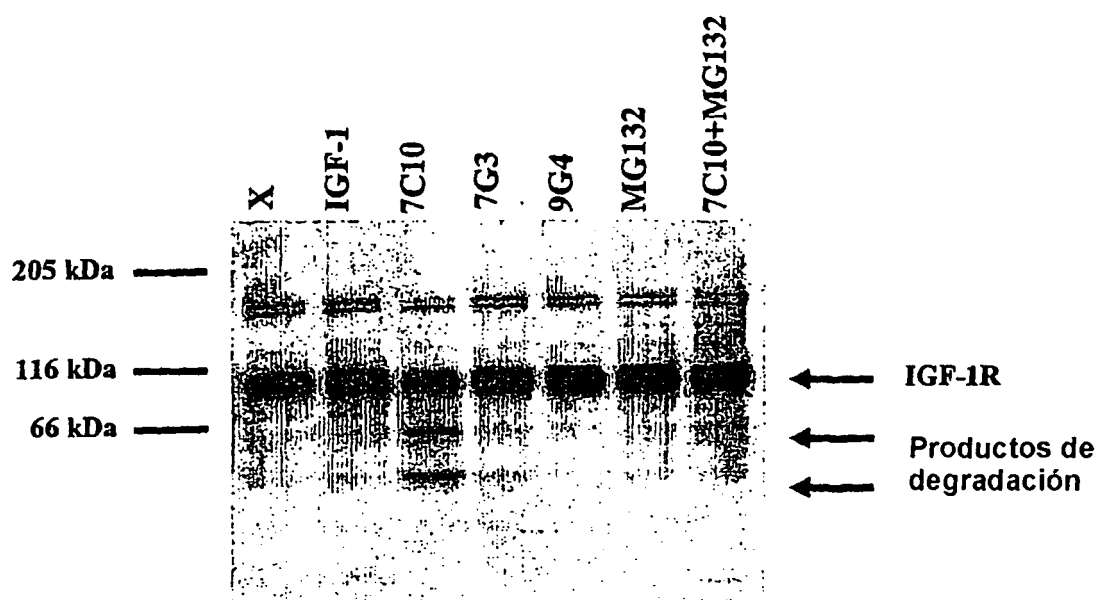


FIGURA 42B

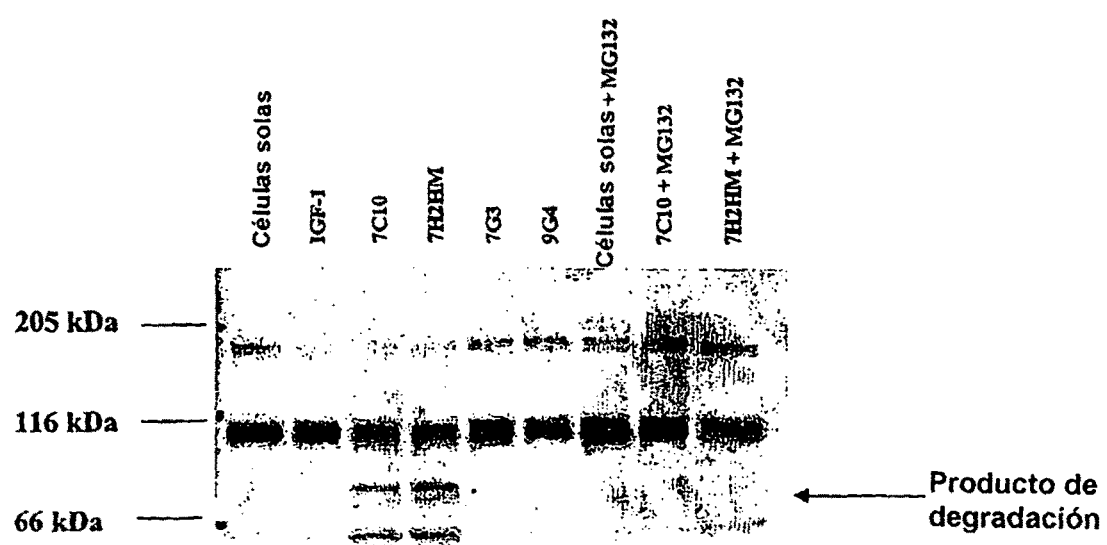


FIGURA 42C

ES 2 283 759 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Pierre Fabre Médicament

5 <120> Nuevos anticuerpos anti-IGF-IR y sus aplicaciones

<130> D19 919 - PCT

10 <150> FR 02/00 653

<151> 18-01-2002

<150> FR 02/00 654

15 <151> 18-01-2002

<150> FR 02/05 753

<151> 07-05-2002

20

<160> 156

<170> PatentIn Ver. 2.1

25

<210> 1

<211> 48

<212> ADN

30

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> CDS

35

<222> (1)..(48)

<400> 1

40

```
aga tct agt cag agc att gta cat agt aat gga aac acc tat tta caa 48
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln
  1             5             10             15
```

45

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

50

<213> *Mus musculus*

<400> 2

55

```
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln
  1             5             10             15
```

<210> 3

60

<211> 21

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

65

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(21)

ES 2 283 759 T3

<400> 3
 aaa gtt tcc aac cga ctt tat
 Lys Val Ser Asn Arg Leu Tyr 21
 5 1 5
 <210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 10 <213> *Mus musculus*
 <400> 4
 15 Lys Val Ser Asn Arg Leu Tyr
 1 5
 <210> 5
 20 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 25 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(27)
 30 <400> 5
 ttt caa ggt tca cat gtt ccg tgg acg
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr 27
 35 1 5
 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 40 <213> *Mus musculus*
 <400> 6
 45 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 7
 50 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 55 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(18)
 60 <400> 7
 ggt ggt tat tta tgg aac
 Gly Gly Tyr Leu Trp Asn 18
 65 1 5
 <210> 8

ES 2 283 759 T3

<211> 6
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 5
 <400> 8
 Gly Gly Tyr Leu Trp Asn
 1 5
 10
 <210> 9
 <211> 48
 15 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 <220>
 20 <221> CDS
 <222> (1)..(48)
 <400> 9
 25
 tac ata agc tac gac ggt acc aat aac tac aaa cca tct ctc aaa gat 48
 Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Asp
 1 5 10 15
 30
 <210> 10
 <211> 16
 35 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 10
 40 Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Asp
 1 5 10 15
 45
 <210> 11
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 50
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(24)
 55
 <400> 11
 60
 tac ggt agg gtc ttc ttt gac tac 24
 Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr
 1 5
 65
 <210> 12
 <211> 8
 <212> PRT

ES 2 283 759 T3

	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 12	
5	Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr 1 5	
	<210> 13	
10	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
15	<400> 13	
	atgaaatgca gctgggtcat sttctt	26
20	<210> 14	
	<211> 26	
	<212> ADN	
25	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 14	
30	atgggatgga gctrtatcat sytctt	26
	<210> 15	
	<211> 26	
35	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 15	
40	atgaagwtgt ggtaaactg ggtttt	26
	<210> 16	
45	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
50	<400> 16	
	atgractttg ggytcagctt grt	23
55	<210> 17	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
60	<400> 17	
	atggactcca ggctcaattt agtttt	26
65	<210> 18	
	<211> 26	

ES 2 283 759 T3

	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
5	<400> 18	
	atggctgtcy trgsgetrct cttctg	26
10	<210> 19	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
15	<400> 19	
	atggratgga gckggrtctt tmtctt	26
20	<210> 20	
	<211> 23	
	<212> ADN	
25	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 20	
30	atgagagtgc tgattctttt gtg	23
	<210> 21	
	<211> 26	
35	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 21	
40	atggmttggg tgtggamcctt gctatt	26
	<210> 22	
45	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
50	<400> 22	
	atgggcagac ttacattctc attcct	26
55	<210> 23	
	<211> 28	
	<212> ADN	
60	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 23	
65	atggattttg ggctgatttt ttttattg	28
	<210> 24	
	<211> 26	

ES 2 283 759 T3

	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
5	<400> 24	
	atgatggtgt taagtcttct gtacct	26
10	<210> 25	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
15	<400> 25	
	atgaagttgc ctgttaggct gttggtgct	29
20	<210> 26	
	<211> 29	
	<212> ADN	
25	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 26	
30	atggagwcag acacactcct gytatgggt	29
	<210> 27	
	<211> 23	
35	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 27	
40	atgagtgtgc tcactcaggt cct	23
	<210> 28	
45	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
50	<400> 28	
	atgaggrccc ctgctcagwt tyttgg	26
55	<210> 29	
	<211> 29	
	<212> ADN	
60	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 29	
65	atggattwc aggtgcagat twtcagctt	29
	<210> 30	
	<211> 29	

ES 2 283 759 T3

	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
5	<400> 30	
	atggatttc argtcagat twtcagctt	29
10	<210> 31	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
15	<400> 31	
	atgaggtkcy ytgysagyt yctgrg	26
20	<210> 32	
	<211> 23	
	<212> ADN	
25	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 32	
30	atgggcwtca agatggagtc aca	23
	<210> 33	
	<211> 29	
35	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 33	
40	atgtggggay ctktttymm ttttcaat	29
	<210> 34	
45	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
50	<400> 34	
	atggrtcw casctcagtt cctt	24
55	<210> 35	
	<211> 26	
	<212> ADN	
60	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 35	
65	atgtatatat gttgtgtc tatttc	26
	<210> 36	
	<211> 26	

ES 2 283 759 T3

	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
5	<400> 36	
	atggaagccc cagctcagct tctctt	26
10	<210> 37	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
15	<400> 37	
	atgragtywc agaccaggt ctttyt	26
20	<210> 38	
	<211> 26	
	<212> ADN	
25	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 38	
30	atggagacac attctcaggt ctttgt	26
	<210> 39	
	<211> 26	
35	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 39	
40	atggattcac aggcccaggt tcttat	26
	<210> 40	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
50	<400> 40	
	actggatggt gggaagatgg	20
55	<210> 41	
	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> <i>Mus musculus</i>	
60	<220>	
	<221> CDS	
65	<222> (1)..(42)	

ES 2 283 759 T3

<400> 41

gct gat gct gca cca act gta tcc atc ttc cca cca tcc agt 42
Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
5 1 5 10

<210> 42

<211> 14

10 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 42

15 Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10

20 <210> 43

<211> 20

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

25

<400> 43

ccatcttccc accatccagt 20

30

<210> 44

<211> 18

<212> ADN

35 <213> *Mus musculus*

<400> 44

40 ccagtggata gacagatg 18

<210> 45

<211> 33

45 <212> ADN

<213> *Mus musculus*

<220>

50 <221> CDS

<222> (1)..(33)

<400> 45

55 gcc aaa acg aca ccc cca tct gtc tat cca ctg 33
Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu
1 5 10

60

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

65 <213> *Mus musculus*

ES 2 283 759 T3

<400> 46

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu
1 5 10

5

<210> 47

<211> 21

<212> ADN

10 <213> *Mus musculus*

<400> 47

15 ccccatctg tctatccact g 21

<210> 48

<211> 438

20 <212> ADN

<213> *Mus musculus*

<220>

25 <221> CDS

<222> (28)..(393)

30 <400> 48

atgaagttgc ctgtaggct gttgggtg ctg atg ttc tgg att cct gct tcc aga 54
Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala Ser Arg
1 5

35 agt gat gtt ttg atg acc caa att cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt 102
Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
10 15 20 25

40 gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc att gta cat 150
Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His
30 35 40

45 agt aat gga aac acc tat tta caa tgg tac ctg cag aaa cca ggt cag 198
Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
45 50 55

50 tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ctt tat ggg gtc 246
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Leu Tyr Gly Val
60 65 70

55 cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag 294
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
75 80 85

atc agc agc gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat tac tgc ttt caa 342
Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln
90 95 100 105

60 ggt tca cat gtt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc 390
Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
110 115 120

65 aaa cgg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc ccaccatcca gt 438
Lys

<210> 49

ES 2 283 759 T3

<211> 122
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 49

```

10      Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala Ser Arg Ser Asp Val Leu Met Thr Gln
        1           5           10           15

      Ile Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser
        20           25           30

15      Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu
        35           40           45

20      Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
        50           55           60

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

25      Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu
        85           90           95

30      Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr
        100          105          110

      Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
        115          120
  
```

35

<210> 50
 <211> 438
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

40

<400> 50

45

```

      tacttcaacg gacaatccga caaccacgac tacaagacct aaggacgaag gtcttcacta 60
      caaaactact ggggtttaagg tgagagggac ggacagtcag aacctctagt tcggaggtag 120
      agaacgtcta gatcagtcctc gtaacatgta tcattacctt tgtggataaa tgttaccatg 180
50      gacgtctttg gtccagtcag aggtttcgag gactagatgt ttcaaagggt ggctgaaata 240
      ccccagggtc tgtccaagtc accgtcacct agtccctgtc taaagtgtga gttctagtcg 300
      tcgcacctcc gactcctaga ccctcaaata atgacgaaag ttccaagtgt acaaggcacc 360
      tgcaagccac ctccgtgggt cgacctttag tttgcccgac tacgacgtgg ttgacatagg 420
55      tagaagggtg gtaggtca
                                     438
  
```

55

<210> 51
 <211> 438
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

60

<220>
 <221> CDS
 <222> (25)..(405)

65

ES 2 283 759 T3

<400> 51

5	atgatggtgt taagtcttct gtac ctc ttg aca gcc att cct ggt atc ctg	51
	Leu Leu Thr Ala Ile Pro Gly Ile Leu	
	1 5	
10	tct gat gta cag ctt cag gag tca gga cct ggc ctc gtg aaa cct tct	99
	Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser	
	10 15 20 25	
15	cag tct ctg tct ctc acc tgc tct gtc acc ggc tac tcc atc acc ggt	147
	Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Gly	
	30 35 40	
20	ggt tat tta tgg aac tgg atc cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg gag	195
	Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu	
	45 50 55	
25	tgg atg ggc tac ata agc tac gac ggt acc aat aac tac aaa cca tct	243
	Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser	
	60 65 70	
30	ctc aaa gat cga atc tcc atc act cgt gac aca tct aag aac cag ttt	291
	Leu Lys Asp Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe	
	75 80 85	
35	ttc ctg aag ttg aat tct gtg act aat gaa gac aca gct aca tat tac	339
	Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr	
	90 95 100 105	
40	tgt gca aga tac ggt agg gtc ttc ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc	387
	Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	
	110 115 120	
45	act ctc aca gtc tcc tca gccaaaacga caccceccatc tgtctatcca ctg	438
	Thr Leu Thr Val Ser Ser	
	125	

<210> 52

<211> 127

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

55

60

65

ES 2 283 759 T3

<400> 52

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

<210> 53

<211> 438

35 <212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 53

40	tactaccaca	attcagaaga	catggacaac	tgtcggtaag	gaccatagga	cagactacat	60
	gtcgaagtcc	tcagtcctgg	accggagcac	tttggaaagag	tcagagacag	agagtggacg	120
	agacagtggc	cgatgaggta	gtggccacca	ataaataacct	tgacctaggc	cgtcaaaggt	180
	cctttgtttg	acctcaccta	cccgatgtat	tcgatgctgc	catgggttatt	gatgtttggg	240
45	agagagtttc	tagcttagag	gtagtgagca	ctgtgtagat	tcttggtcaa	aaaggacttc	300
	aacttaagac	actgattact	tctgtgtcga	tgtataatga	cacgttctat	gccatcccag	360
	aagaaactga	tgaccccggt	tccgtggtga	gagtgtcaga	ggagtcggtt	ttgctgtggg	420
50	ggtagacaga	taggtgac					438

<210> 54

 $\langle 211 \rangle$ 112

55 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

60

65

ES 2 283 759 T3

<400> 54

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

<210> 55

<211> 112

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 55

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

<210> 56

<211> 112

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

ES 2 283 759 T3

<400> 56

```

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

```

<210> 57

25 <211> 112

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

30 <400> 57

```

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

```

<210> 58

60 <211> 112

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 283 759 T3

<400> 58

```

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

```

25

<210> 59

<211> 100

<212> PRT

30

<213> *Homo sapiens*

<400> 59

```

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

```

55

<210> 60

60

<211> 112

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

65

<220>

<221> VARIANT

ES 2 283 759 T3

<222> (35)..(36)

<223> XAA corresponde a cualquier aminoácido

5 <220>

<221> VARIANT

<222> (39)

<223> XAA corresponde a cualquier aminoácido

10

<220>

<221> VARIANT

<222> (99)

15

<223> XAA corresponde a cualquier aminoácido

<400> 60

20

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

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

25

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

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

30

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

35

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

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

40

<210> 61

<211> 112

<212> PRT

45

<213> *Homo sapiens*

<400> 61

50

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

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

55

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

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

60

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

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

65

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

ES 2 283 759 T3

<210> 62

<211> 433

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

10 <222> (22)..(414)

<400> 62

```

15      gtcagaacgc gtgccgccac c atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg 51
           Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu
           1 5 10

20      atg ttc tgg ttt cct gct tcc agc agt gat gtt gtg atg act cag tct 99
           Met Phe Trp Phe Pro Ala Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
           15 20 25

25      cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgc 147
           Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
           30 35 40

30      agg tct agt cag agc att gta cat agt aat gga aac acc tat ttg caa 195
           Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln
           45 50 55

35      tgg tac ctg cag aag cca ggg cag tct cca cag ctc ctg atc tat aaa 243
           Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys
           60 65 70

40      gtt tct aat cgg ctt tat ggg gtc cct gac agg ttc agt ggc agt gga 291
           Val Ser Asn Arg Leu Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
           75 80 85 90

45      tca ggc aca gat ttt aca ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat 339
           Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp
           95 100 105

50      gtt ggg gtt tat tac tgc ttt caa ggt tca cat gtt ccg tgg acg ttc 387
           Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe
           110 115 120

55      ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt gagtggatcc tctgcg 433
           Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
           125 130

```

<210> 63

<211> 131

<212> PRT

50 <213> *Homo sapiens*

55

60

65

ES 2 283 759 T3

<400> 63

```

5      Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Phe Pro Ala
      1          5          10          15

      Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
          20          25          30

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

      Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
      50          55          60

      Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Leu Tyr
      65          70          75          80

20     Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
          85          90          95

      Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
      100         105         110

      Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
      115         120         125

30     Glu Ile Lys
      130

```

35 <210> 64

<211> 433

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

40

<400> 64

```

45     cagtcttgcg cacggcggtg gtacttcaac ggacaatccg acaaccacga ctacaagacc 60
      aaaggacgaa ggtcgtcact acaacactac tgagtcagag gtgagagggg cgggcagtg 120
      ggacctctcg gccggaggta gaggacgtcc agatcagttc cgtaacatgt atcattacct 180
      ttgtggataa acgttaccat ggacgtcttc ggtcccggtc gaggtgtcga ggactagata 240
      tttcaaagat tagccgaaat accccaggga ctgtccaagt caccgtcacc tagtccgtgt 300
50     ctaaaatgtg acttttagtc gtctcacctc cgactcctac aaccccaa atgacgaaa 360
      gttccaagtg tacaaggcac ctgcaagccg gttccctggt tccaccttta gtttgcactc 420
      acctaggaga cgc                                     433

```

55 <210> 65

<211> 112

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

60

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

65

ES 2 283 759 T3

<400> 65

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

30 <210> 66
 <211> 433
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <220>
 <221> CDS
 40 <222> (22)..(414)

45

50

55

60

65

ES 2 283 759 T3

<400> 66

5	gtcagaacgc gtgccgccac c atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg	51
	Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu	
	1 5 10	
10	atg ttc tgg ttt cct gct tcc agc agt gat att gtg atg act cag tct	99
	Met Phe Trp Phe Pro Ala Ser Ser Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser	
	15 20 25	
15	cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgc	147
	Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys	
	30 35 40	
20	agg tct agt cag agc att gta cat agt aat gga aac acc tat ttg caa	195
	Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln	
	45 50 55	
25	tgg tac ctg cag aag cca ggg cag tct cca cag ctc ctg atc tat aaa	243
	Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys	
	60 65 70	
30	gtt tct aat cgg ctt tat ggg gtc cct gac agg ttc agt ggc agt gga	291
	Val Ser Asn Arg Leu Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly	
	75 80 85 90	
35	tca ggc aca gat ttt aca ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat	339
	Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp	
	95 100 105	
40	gtt ggg gtt tat tac tgc ttt caa ggt tca cat gtt ccg tgg acg ttc	387
	Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe	
	110 115 120	
45	ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt gaggatgcc tctgcg	433
	Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
	125 130	

<210> 67

<211> 131

50 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

55

60

65

ES 2 283 759 T3

<400> 67

```

5      Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Phe Pro Ala
      1          5          10          15

      Ser Ser Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
          20          25          30

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

15     Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
      50          55          60

      Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Leu Tyr
20     65          70          75          80

      Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
          85          90          95

25     Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
          100          105          110

      Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
30     115          120          125

      Glu Ile Lys
      130

```

<210> 68

<211> 433

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 68

```

45     cagtcttgcg cacggcgggtg gtacttcaac ggacaatccg acaaccacga ctacaagacc 60
      aaaggacgaa ggtcgctcact acaacactac tgagtcagag gtgagaggga cgggcagtg 120
      ggacctctcg gccggaggta gaggacgtcc agatcagttc cgtaacatgt atcattacct 180
      ttgtggataa acggttaccat ggacgtcttc ggtcccgtca gaggtgtcga ggactagata 240
50     tttcaaagat tagccgaaat accccaggga ctgtccaagt caccgtcacc tagtccgtgt 300
      ctaaaatgtg acttttagtc gtctcacctc cgactcctac aaccccaaata atgacgaaa 360
      gttccaagtg tacaaggcac ctgcaagccg gttccctggt tccaccttta gtttgcactc 420
      acctaggaga cgc
      433

```

<210> 69

<211> 117

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

65

ES 2 283 759 T3

<400> 69

```

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

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

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

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

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

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

25     Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
          100          105          110

      Leu Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 70

<211> 118

<212> PRT

35 <213> *Mus musculus*

<400> 70

```

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

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

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

50     Met Gly Tyr Ile Asn Tyr Asp Gly Asn Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
      50          55          60

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

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

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

      Thr Leu Thr Val Ser Ser
          115

```

65 <210> 71

<211> 118

ES 2 283 759 T3

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

5 <400> 71

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

<210> 72

35 <211> 117

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

40 <400> 72

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

ES 2 283 759 T3

<210> 73

<211> 123

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 73

```

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

      Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Gly
15              20              25              30

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

20      Ile Gly Ser Met Phe His Ser Gly Ser Ser Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu
        50              55              60

      Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
25      65              70              75              80

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

30      Ala Arg Gly Arg Tyr Cys Ser Ser Thr Ser Cys Asn Trp Phe Asp Pro
              100              105              110

      Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
35              115              120

```

<210> 74

40 <211> 98

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

45 <400> 74

```

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

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

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

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

      Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
60      65              70              75              80

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

65      Ala Arg

```

<210> 75

ES 2 283 759 T3

<211> 117

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5

<400> 75

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

<210> 76

35 <211> 445

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

40 <220>

<221> CDS

<222> (22)..(926)

45

50

55

60

65

ES 2 283 759 T3

<400> 76

5	gtcagaacgc gtgccgccac c atg aaa gtg ttg agt ctg ttg tac ctc ttg	51
	Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu	
	1 5 10	
10	aca gcc att cct ggt atc ctg tct cag gtg cag ctt cag gag tcg ggc	99
	Thr Ala Ile Pro Gly Ile Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly	
	15 20 25	
15	cca gga ctg gtg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc	147
	Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val	
	30 35 40	
20	tct ggt tac tcc atc acc ggt ggt tat tta tgg aac tgg ata cgg cag	195
	Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Gly Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln	
	45 50 55	
25	ccc cca ggg aag gga ctg gag tgg atg ggg tat atc agc tac gac ggt	243
	Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly	
	60 65 70	
30	acc aat aac tac aaa ccc tcc ctc aag gat cga atc acc ata tca cgt	291
	Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Asp Arg Ile Thr Ile Ser Arg	
	75 80 85 90	
35	gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gct	339
	Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala	
	95 100 105	
40	gcg gac act gca gtg tat tac tgt gcg aga tac ggt agg gtc ttc ttt	387
	Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe	
	110 115 120	
45	gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca ggtgagtgga	436
	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
	125 130	
50	tcctctgcg	445
	<210> 77	
	<211> 135	
	<212> PRT	
55	<213> <i>Homo sapiens</i>	
60		
65		

ES 2 283 759 T3

<400> 77

```

5      Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu Thr Ala Ile Pro Gly Ile
      1          5          10          15

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

10     Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
      35          40          45

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

      Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro
      65          70          75          80

20     Ser Leu Lys Asp Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
      85          90          95

25     Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
      100          105          110

      Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
      115          120          125

30     Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      130

```

35 <210> 78

<211> 445

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

40

<400> 78

```

45     cagtcttgcg cacggcggtg gtactttcac aactcagaca acatggagaa ctgtcggtaa 60
      ggaccatagg acagagtcca cgtcgaagtc ctcagcccg gtcctgacca cttcggaagc 120
      ctctgggaca gggagtggac gtgacagaga ccaatgaggt agtggccacc aataaatacc 180
      ttgacctatg ccgtcggggg tcccttccct gacctcacct accccatata gtcgatgctg 240
      ccatggttat tgatgtttgg gagggagttc ctagcttagt ggtatagtgc actgtgcagg 300
50     ttcttggtca agagggactt cgactcgaga cactggcgac gcctgtgacg tcacataatg 360
      acacgctcta tgccatccca gaagaaactg atgaccccg tcccttgga cagtggcag 420
      aggagtccac tcacctagga gacgc 445

```

55 <210> 79

<211> 117

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

60

65

ES 2 283 759 T3

<400> 79

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

<210> 80

<211> 445

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (22)..(426)

ES 2 283 759 T3

<400> 80

5	gtcagaacgc gtgccgccac c atg aaa gtg ttg agt ctg ttg tac ctc ttg	51
	Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu	
	1 5 10	
10	aca gcc att cct ggt atc ctg tct cag gtg cag ctt cag gag tgc ggc	99
	Thr Ala Ile Pro Gly Ile Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly	
	15 20 25	
15	cca gga ctg gtg aag cct tgc gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc	147
	Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val	
	30 35 40	
20	tct ggt tac tcc atc acc ggt ggt tat tta tgg aac tgg ata cgg cag	195
	Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Gly Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln	
	45 50 55	
25	ccc cca ggg aag gga ctg gag tgg atc ggg tat atc agc tac gac ggt	243
	Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly	
	60 65 70	
30	acc aat aac tac aaa ccc tcc ctc aag gat cga gtc acc ata tca cgt	291
	Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Asp Arg Val Thr Ile Ser Arg	
	75 80 85 90	
35	gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gct	339
	Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala	
	95 100 105	
40	gcg gac act gca gtg tat tac tgt gcg aga tac ggt agg gtc ttc ttt	387
	Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe	
	110 115 120	
45	gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca ggtgagtgga	436
	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
	125 130	
50	tcctctgcg	445

<210> 81

50 <211> 135

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

55

60

65

ES 2 283 759 T3

<400> 81

```

5      Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu Thr Ala Ile Pro Gly Ile
      1          5          10          15

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

10     Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
      35          40          45

      Gly Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
15     50          55          60

      Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro
      65          70          75          80

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

      Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
25     100         105         110

      Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
      115         120         125

30     Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      130

```

<210> 82

<211> 445

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

40

<400> 82

```

45     cagtcttgcg cacggcggtg gtactttcac aactcagaca acatggagaa ctgtcggtaa 60
      ggaccatagg acagagtcca cgtcgaagtc ctcagcccgg gtcctgacca cttcggaagc 120
      ctctgggaca gggagtggac gtgacagaga ccaatgaggt agtcgccacc aataaatacc 180
      ttgacctatg ccgtcggggg tcccttccct gacctcacct agcccatata gtcgatgctg 240
      ccatggttat tgatgtttgg gagggagttc ctagctcagt ggtatagtgc actgtgcagg 300
50     ttcttggtca agagggactt cgactcgaga cactggcgac gcctgtgacg tcacataatg 360
      acacgctcta tgccatccca gaagaaactg atgaccccgg tcccttgga ccaagtggcag 420
      aggagtcac tcacctagga gacgc                                     445

```

<210> 83

<211> 117

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

60

65

ES 2 283 759 T3

<400> 83

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

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

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

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

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

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

 Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

 Val Thr Val Ser Ser
 115

30

<210> 84

<211> 445

<212> ADN

35 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

40 <222> (22)..(426)

45

50

55

60

65

ES 2 283 759 T3

<400> 84

```

5      gtcagaacgc gtgccgccac c atg aaa gtg ttg agt ctg ttg tac ctc ttg 51
      Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu
      1 5 10

10     aca gcc att cct ggt atc ctg tct cag gtg cag dtt cag gag tcg ggc 99
      Thr Ala Ile Pro Gly Ile Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly
      15 20 25

15     cca gga ctg gtg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc 147

20     Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val
      30 35 40

25     tct ggt tac tcc atc agc ggt ggt tat tta tgg aac tgg ata cgg cag 195
      Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Gly Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln
      45 50 55

30     ccc cca ggg aag gga ctg gag tgg atc ggg tat atc agc tac gac ggt 243
      Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly
      60 65 70

35     acc aat aac tac aaa ccc tcc ctc aag gat cga gtc acc ata tca gtg 291
      Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Asp Arg Val Thr Ile Ser Val
      75 80 85 90

40     gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gct 339
      Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
      95 100 105

45     gcg gac act gca gtg tat tac tgt gcg aga tac ggt agg gtc ttc ttt 387
      Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe
      110 115 120

50     gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca ggtgagtggga 436
      Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      125 130

50     tcctctgcg 445

```

<210> 85

<211> 135

55 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

60

65

ES 2 283 759 T3

<400> 85

Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu Thr Ala Ile Pro Gly Ile
 1 5 10 15
 Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
 20 25 30
 Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
 35 40 45
 Gly Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Asp Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 85 90 95
 Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130

<210> 86

<211> 445

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 86

cagtcttgcg cacggcgggtg gtactttcac aactcagaca acatggagaa ctgtcggtaa 60
 ggaccatagg acagagtcca cgtcgaagtc ctcagcccg gtcctgacca cttcggaagc 120
 ctctggggaca gggagtggac gtgacagaga ccaatgaggt agtcgccacc aataaatacc 180
 ttgacctatg ccgtcggggg tcccttcctt gacctcacct agcccatata gtcgatgctg 240
 ccatgggttat tgatgtttgg gagggagttc ctagctcagt ggtatagtca cctgtgcagg 300
 ttcttggtca agagggactt cgactcgaga cactggcgac gcctgtgacg tcacataatg 360
 acacgctcta tgccatccca gaagaaactg atgaccccg tcccttgga ctagtggcag 420
 aggagtccac tcacctagga gacgc 445

<210> 87

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 87

gtcagaacgc gtgcccgc

ES 2 283 759 T3

<210> 88
 <211> 32
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido
 10
 <400> 88

 accatgaagt tgcctgtag gctgttggtg ct 32
 15
 <210> 89
 <211> 32
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido
 25
 <400> 89

 gatgttctgg tttctgctt ccagcagtga tg 32
 30
 <210> 90
 <211> 32
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido
 40
 <400> 90

 ttgtgatgac tcagtctcca ctctccctgc cc 32
 45
 <210> 91
 <211> 32
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido
 55
 <400> 91

 gtcaccctg gagagccggc ctccatctcc tg 32
 60
 <210> 92
 <211> 32
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 283 759 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
5	<400> 92	
	caggtctagt cagaccatta tacatagtaa tg	32
10	<210> 93	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
20	<400> 93	
	gaaacaccta ttggaatgg tacctgcaga	30
25	<210> 94	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
35	<400> 94	
	ggcaacttca tgggtggcggc acgcgttctg ac	32
40	<210> 95	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
50	<400> 95	
	gaaaccagaa catcagcacc aacagcctaa ca	32
55	<210> 96	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
65	<400> 96	
	ctgagtcac acaacatcac tgctggaagc ag	32

ES 2 283 759 T3

	<210> 97	
	<211> 32	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
10	<400> 97	
	tctccagggg tgacgggcag ggagagtgga ga	32
15	<210> 98	
	<211> 32	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
25	<400> 98	
	tctgactaga cctgcaggag atggaggccg gc	32
30	<210> 99	
	<211> 31	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
40	<400> 99	
	aaataggtgt ttccattact atgtacaatg c	31
45	<210> 100	
	<211> 32	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
55	<400> 100	
	cagggcagtc tccacagctc ctgatctata aa	32
60	<210> 101	
	<211> 32	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 283 759 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
5	<400> 101	
	gtttctaadc ggctttatgg ggtccctgac ag	32
10	<210> 102	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
20	<400> 102	
	gttcagtggc agtggatcag gcacagattt ta	32
25	<210> 103	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
35	<400> 103	
	cactgaaaat cagcagagtg gaggctgagg at	32
40	<210> 104	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
50	<400> 104	
	gttgggggttt attactgctt tcaaggttca ca	32
55	<210> 105	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
65	<400> 105	
	tgttcggtgg acgttcggcc aaggaccaa gg	32

ES 2 283 759 T3

	<210> 106	
	<211> 30	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
10	<400> 106	
	tggaatcaa acgtgagtgg atcctctgcg	30
15	<210> 107	
	<211> 17	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
25	<400> 107	
	tctgcaggta ccattgc	17
30	<210> 108	
	<211> 21	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
40	<400> 108	
	tgcaatggta cctgcagaag c	21
45	<210> 109	
	<211> 32	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
55	<400> 109	
	agactgccct ggcttctgca ggtaccattg ca	32
60	<210> 110	
	<211> 32	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 283 759 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
5	<400> 110	
	cgattagaaa ctttatagat caggagctgt gg	32
10	<210> 111	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
20	<400> 111	
	tgccactgaa cctgtcaggg accccataaa gc	32
25	<210> 112	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
35	<400> 112	
	gattttcagt gtaaaatctg tgctgatcc ac	32
40	<210> 113	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
50	<400> 113	
	taaaccceaa catctcagc ctccactctg ct	32
55	<210> 114	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
65	<400> 114	
	tccacggaac atgtgaacct tgaaagcagt aa	32

ES 2 283 759 T3

	<210> 115	
	<211> 31	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
10	<400> 115	
	tttgatttcc accttggtcc ctggccgaa c	31
15	<210> 116	
	<211> 19	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
25	<400> 116	
	cgcagaggat ccactcacg	19
30	<210> 117	
	<211> 18	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
40	<400> 117	
	gtcagaacgc gtgccgcc	18
45	<210> 118	
	<211> 34	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
55	<400> 118	
	accatgaaag tgttgagtct gttgtacctc ttga	34
60	<210> 119	
	<211> 34	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 283 759 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
5	<400> 119	
	cagccattcc tggatcctg tctcaggtgc agct	34
10	<210> 120	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
20	<400> 120	
	tcaggagtcg ggcccaggac tggtaagcc ttcg	34
25	<210> 121	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
35	<400> 121	
	gagaccctgt ccctcacctg cactgtctct ggt	33
40	<210> 122	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
50	<400> 122	
	tactccatca ccggtgggta ttatggaac tgg	33
55	<210> 123	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
65	<400> 123	
	atacggcagc cccaggga gggactggag tgg	33

ES 2 283 759 T3

	<210> 124	
	<211> 33	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
	<400> 124	
	atgggggtata tcagctacga cggtagcaat aac	33
15	<210> 125	
	<211> 34	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
	<400> 125	
	tcaacacttt catggtggcg gcacgcgttc tgac	34
30	<210> 126	
	<211> 34	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
	<400> 126	
	ataccaggaa tggctgtcaa gaggtacaac agac	34
45	<210> 127	
	<211> 34	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
	<400> 127	
	tgggccccgac tcctgaagct gcacctgaga cagg	34
60	<210> 128	
	<211> 34	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 283 759 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
5	<400> 128	
	tgagggacag ggtctccgaa ggcttcacca gtcc	34
10	<210> 129	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
20	<400> 129	
	ccaccggtga tggagtaacc agagacagtg cagg	34
25	<210> 130	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
35	<400> 130	
	ccctgggggc tgccgtatcc agttccataa ataa	34
40	<210> 131	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
50	<400> 131	
	tagctgatat accccatcca ctccagtcct tt	32
55	<210> 132	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
65	<400> 132	
	gttattgta ccgtcg	16

ES 2 283 759 T3

	<210> 133	
	<211> 21	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
10	<400> 133	
	tacgacggta ccaataacta c	21
15	<210> 134	
	<211> 32	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
25	<400> 134	
	aaaccctccc tcaaggatcg aatcaccata tc	32
30	<210> 135	
	<211> 32	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
40	<400> 135	
	acgtgacacg tccaagaacc agttctcct ga	32
45	<210> 136	
	<211> 32	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
55	<400> 136	
	agctgagctc tgtgaccgct gcggacactg ca	32
60	<210> 137	
	<211> 32	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 283 759 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
5	<400> 137	
	gtgtattact gtgcgagata cggtagggtc tt	32
10	<210> 138	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
20	<400> 138	
	ctttgactac tggggccagg gaaccctggt ca	32
25	<210> 139	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
35	<400> 139	
	ccgtctctc aggtgagtgg atcctctgcg	30
40	<210> 140	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
50	<400> 140	
	agggagggtt ttagttatt ggtaccgtcg ta	32
55	<210> 141	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
65	<400> 141	
	acgtgtcacg tgatatggtg attcgatcct tg	32

ES 2 283 759 T3

	<210> 142	
	<211> 32	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
10	<400> 142	
	agagctcagc ttcaggaga actggttctt gg	32
15	<210> 143	
	<211> 32	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
25	<400> 143	
	cagtaataca ctgcagtgtc cgcagcggtc ac	32
30	<210> 144	
	<211> 32	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
40	<400> 144	
	agtagtcaaa gaagacccta ccgtatctcg ca	32
45	<210> 145	
	<211> 33	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido	
55	<400> 145	
	ctgaggagac ggtgaccagg gtccctggc ccc	33
60	<210> 146	
	<211> 18	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	

ES 2 283 759 T3

	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido		
5	<400> 146		
	cgcagaggat ccaactcac		18
10	<210> 147		
	<211> 31		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
15	<400> 197		
	ctgggttactc catcagcggg ggttatttat g		31
20	<210> 148		
	<211> 31		
	<212> ADN		
25	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 148		
30	cataaataac caccgctgat ggagtaacca g		31
	<210> 149		
	<211> 31		
35	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 149		
40	gggactggag tggatcgggt atatcagcta c		31
	<210> 150		
45	<211> 31		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
50	<400> 150		
	gtagctgata taccgatcc actccagtcc c		31
55	<210> 151		
	<211> 31		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
60	<400> 151		
	tcctcaagg atcgagtcac catatcacgt g		31
65	<210> 152		
	<211> 31		

ES 2 283 759 T3

	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
5	<400> 152	
	cacgtgatat ggtgactcga tccttgaggg a	31
10	<210> 153	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 153	
	gatcgagtca ccatatcagt ggacacgtcc aagaaccag	39
20	<210> 154	
	<211> 39	
	<212> ADN	
25	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 154	
30	ctggttcttg gacgtgtcca ctgatatggt gactcgatc	39
	<210> 155	
	<211> 31	
35	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 155	
40	gcttccagca gtgatattgt gatgactcag t	31
	<210> 156	
45	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<400> 156	
	actgagtcac cacaatatca ctgctggaag c	31
55		
60		
65		