

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2006.06.19</b>	(73) Titular(es): <b>PHILADELPHIA HEALTH AND EDUCATION CORPORATION D/B/A DREXEL UNIVERSITY COLLEGE OF MEDICINE 245 NORTH 15TH STREET PHILADELPHIA, PA 19102 US</b>
(30) Prioridade(s): <b>2005.06.17 US 691920 P</b>	<b>IMCLONE LLC US</b>
(43) Data de publicação do pedido: <b>2009.09.16</b>	(72) Inventor(es): <b>NICK LOIZOS US NATHAN GRAEME DOLLOFF US ALESSANDRO FATATIS US</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2014.02.12 068/2014</b>	(74) Mandatário: <b>ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT</b>

(54) Epígrafe: **UM ANTICORPO ANTI-PDGFR-ALFA PARA O TRATAMENTO DE CANCRO ÓSSEO METASTÁTICO**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO PROPORCIONA MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE CANCRO ÓSSEO, EM PARTICULAR O CANCRO ÓSSEO METASTÁTICO, ATRAVÉS DA ADMINISTRAÇÃO DE UM ANTAGONISTA IGF-IR E/OU DE UM ANTAGONISTA PDGF. A INVENÇÃO PROPORCIONA TAMBÉM ANTICORPOS QUE SE LIGAM A PDGFR HUMANOS E NEUTRALIZAM A ACTIVAÇÃO DOS RECEPTORES. A INVENÇÃO PROPORCIONA AINDA UM MÉTODO PARA NEUTRALIZAR A ACTIVAÇÃO DE PDGFR, E MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE UM MAMÍFERO COM UMA DOENÇA NEOPLÁSICA UTILIZANDO O ANTICORPO ISOLADAMENTE OU EM COMBINAÇÃO COM OUTROS AGENTES.

**RESUMO****"UM ANTICORPO ANTI-PDGFR-ALFA PARA O TRATAMENTO DE CANCRO  
ÓSSEO METASTÁTICO"**

A invenção proporciona métodos para o tratamento de cancro ósseo, em particular o cancro ósseo metastático, através da administração de um antagonista IGF-IR e/ou de um antagonista PDGFR $\alpha$ . A invenção proporciona também anticorpos que se ligam a PDGFR $\alpha$  humanos e neutralizam a activação dos receptores. A invenção proporciona ainda um método para neutralizar a activação de PDGFR $\alpha$ , e métodos para o tratamento de um mamífero com uma doença neoplásica utilizando o anticorpo isoladamente ou em combinação com outros agentes.

**DESCRIÇÃO****"UM ANTICORPO ANTI-PDGFR-ALFA PARA O TRATAMENTO DE CANCRO  
ÓSSEO METASTÁTICO"**

Este pedido de patente reivindica o benefício do Pedido Provisório U.S. No. 60/691,920.

**CAMPO DA INVENÇÃO**

A divulgação proporciona métodos para o tratamento do cancro ósseo, em particular do cancro metastático ósseo, através da administração um antagonista de IGF-IR e/ou um antagonista de PDGFR $\alpha$ . A presente divulgação proporciona também anticorpos que se ligam a PDGFR $\alpha$  humanos e que neutralizam a activação dos receptores. A presente divulgação proporciona ainda um método para neutralizar a activação de PDGFR $\alpha$ , e um método de tratamento de um mamífero com uma doença neoplásica utilizando os anticorpos isoladamente ou em combinação com outros agentes.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

O cancro de próstata é mais comum entre os homens, com cerca de 220000 casos e 29000 mortes por ano nos Estados Unidos da América. Uma proporção significativa

dos homens diagnosticados com cancro de próstata têm doença metastática. Além disso, as metástases eventualmente se desenvolvem em muitos outros pacientes de cancro de próstata apesar do tratamento com cirurgia ou radioterapia. O osso é o local mais comum da metástase do cancro da próstata, e é também um local para onde o cancro do pulmão e o cancro da mama frequentemente metastizam. A maioria das metástases de próstata são androgénio-dependentes, de modo a que existe uma resposta rápida à castração cirúrgica ou médica, mas em virtualmente todos os pacientes, o tumor eventualmente se torna androgénio independente, conduzindo a uma morbilidade e mortalidade significativas. Assim que as metástases ósseas ocorrem, os tratamentos actualmente disponíveis têm um efeito limitado. A terapia mais eficaz aprovada que foi descrita para o cancro de próstata metastático (administração de docetaxel) prolonga a sobrevivência média em aproximadamente três meses. (Petrylak et al., 2004, N. Engl. J. Med. 351: 1513; Tannock et al., 2004, N. Engl. J. Med. 351: 1502) Assim, novas terapias para o cancro metastático ósseo são urgentemente necessárias.

O receptor do factor de crescimento similar à insulina (IGF-IR) é um receptor de tirosina cinase transmembranar omnipresente que é essencial para o normal crescimento e desenvolvimento fetal e pós-natal. O IGF-IR está localizado na superfície celular da maioria dos tipos de células e serve como molécula sinalizadora para os factores de crescimento IGF-I e IGF-II (colectivamente

denominados doravante IGFs). O IGF-IR pode estimular a proliferação celular, diferenciação celular, alterações no tamanho das células, e proteger as células da apoptose. Foi também considerado como sendo quase obrigatório para transformação de células (revisão em Adams et al., *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1050-93 (2000); Baserga, *Oncogene* 19: 5574-81 (2000)). Elevados níveis de expressão de IGF-IR foram registados em amostras de tecidos de metástases ósseas do cancro da próstata. O osso contém a maior reserva de IGFs no corpo.

O IGF-IR é um hetero-tetrâmero preformado contendo duas cadeias alfa e duas cadeias beta covalentemente ligados por ligações dissulfureto. As subunidades de receptores são sintetizadas como parte de uma única cadeia polipeptídica de 180 kd, que é depois proteoliticamente transformada em subunidades alfa (130 kd) e beta (95 kd). A totalidade da cadeia alfa é extracelular e contém o local para a ligação ao ligando. A cadeia beta possui o domínio transmembranar, o domínio tirosina cinase, e uma extensão C-terminal que é necessária para a diferenciação celular e transformação, mas é dispensável para sinalização de mitogénio e protecção contra apoptose.

O IGF-IR é bastante semelhante ao receptor da insulina (IR), particularmente no interior da sequência da cadeia beta (70% de homologia). Devido a esta homologia, estudos recentes têm demonstrado que estes receptores podem formar híbridos contendo um dímero IR e um dímero IGF-IR

(Pandini et al., *Clin. Canc. Res.* 5: 1935-19 (1999)). A formação de híbridos ocorre tanto em células normais como transformadas e o conteúdo dos híbridos é dependente da concentração dos dois homo-dímeros receptores (IR e IGF-IR) no interior da célula. Embora os receptores híbridos sejam compostos de pares IR e IGF-IR, os híbridos ligam-se selectivamente a IGFs, com afinidade semelhante àquela do IGF-IR, e apenas se ligam fracamente à insulina (Siddle e Soos, *The IGF System*. Human Press, págs. 199-225. 1999). Como tal, esses híbridos podem se ligar a IGFs e converter sinais tanto em células normais como em transformadas.

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

Os receptores de factor de crescimento alfa e beta (PDGFR $\alpha$  e PDGFR $\beta$ ) derivados de plaquetas, são receptores tirosina cinases de tipo III. PDGFR $\alpha$  é crucial para o desenvolvimento e cumpre funções importantes na vida adulta. Por exemplo, ratinhos homozigóticos para uma

mutação nula morrem durante a embriogénese. Em fases posteriores de desenvolvimento, PDGFR $\alpha$  é expresso em muitas estruturas mesenquimais, enquanto que células epiteliais adjacentes produzem plaquetas derivadas dos factores de crescimento (PDGFs). Amostras de tecido de glândulas da próstata normais ou hiperplásicas testam negativo para PDGFR $\alpha$ , enquanto tumores primários de próstata e massas esqueléticas de indivíduos correspondentes expressam PDGFR $\alpha$ . Além disso, de linhagens celulares de próstata obtidas a partir de diferentes locais metastáticos, encontra-se PDGFR $\alpha$  em células PC3 derivadas de metástases óssea, mas não em linhagens celulares obtidas a partir de metástases dos gânglios linfáticos (LNCaP) e do cérebro (DU-145).

A família de factores de crescimento derivada de plaquetas de factores de crescimento consiste em cinco diferentes dímeros ligados por ligações de dissulfureto, PDGF-AA, -BB, -AB, -CC, e -DD, que actuam através de PDGFR $\alpha$  e PDGFR $\beta$ . Estes factores de crescimento são moléculas diméricas compostas por cadeias polipeptídicas ligadas por ligações dissulfureto que se ligam a duas proteínas receptoras simultaneamente e induzem a dimerização, autofosforilação, e sinalização intracelular dos receptores. PDGFR $\alpha$  e PDGFR $\beta$  são estruturalmente semelhantes e podem formar hetero-dímeros bem como homo-dímeros. Dado que PDGFR $\beta$  não se liga à cadeia PDGF-A com grande afinidade, PDGF-AA apenas activa receptores dímeros  $\alpha\alpha$ , enquanto PDGF-AB e PDGF-CC activam receptores hetero-dímeros  $\alpha\alpha$  e  $\alpha\beta$ .

**BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

Esta divulgação refere-se ao tratamento de tumores primários e metástases ósseas, incluindo tumores originados na próstata, mama, pulmão e expressam o receptor do factor de crescimento I similar à insulina (IGF-IR) e/ou o receptor alfa do factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR $\alpha$ ).

Os tumores a serem tratados podem ser dependentes de hormona/androgénio ou independentes de hormona/androgénio, e podem ser originados, por exemplo, na próstata, mama, ou pulmão.

A presente divulgação proporciona métodos para o tratamento de um indivíduo que tenha um tumor ósseo, bem como os métodos de inibir o crescimento de um tumor ósseo. Os métodos compreendem a administração de uma quantidade eficaz de um antagonista IGF-IR ou uma quantidade eficaz de um antagonista de PDGFR $\alpha$ . Os antagonistas dos receptores incluem anticorpos e fragmentos de anticorpos, bem como inibidores intracelulares de moléculas pequenas.

A presente divulgação proporciona anticorpos anti-IGF-IR ou anti-PDGFR $\alpha$  que se ligam aos seus receptores alvo e inibem a ligação ao ligando. A divulgação fornece também anticorpos e outros antagonistas que neutralizam a activação de IGF-IR ou de PDGFR $\alpha$ . Além disso



certos anticorpos promovem uma inibição dos seus receptores alvo, por exemplo, por internalização e/ou degradação. Por conseguinte, os anticorpos e antagonistas de moléculas pequenas funcionam no sentido de inibir a activação de moléculas sinalizadoras a jusante, como Akt, p42/p44, e MAPK.

Os métodos incluem a utilização de antagonistas IGF-IR ou PDGFR $\alpha$  isoladamente, em combinação uns com os outros ou em combinação com outros tratamentos para o cancro, tais como quimioterapia e radioterapia.

A presente divulgação proporciona também anticorpos e fragmentos de anticorpos que se ligam a PDGFR $\alpha$ , bem como nucleótidos e a célula hospedeira para a produção de anticorpos. Os anticorpos bloqueiam a ligação ao ligando e neutralizam a activação de receptores. A divulgação também proporciona a utilização dos anticorpos sozinhos, em combinação com outros antagonistas de receptores ou agentes antineoplásicos, ou como conjugados para o tratamento de doença neoplásica. Anticorpos anti-PDGFR $\alpha$  são utilizados para tratar, por exemplo, tumores de ovário, tumores de mama, tumores pulmonares, tumores hepatocelulares, tumores estromais gastrointestinais, melanomas, carcinoma das células renais, tumores da próstata, e sarcomas dos tecidos moles.

De acordo com a presente invenção, proporciona-se um antagonista de PDGFR $\alpha$  para utilização no tratamento de

um indivíduo com cancro ósseo metastático, em que o referido antagonista PDGFR $\alpha$  é um anticorpo ou um seu fragmento que é específico para PDGFR $\alpha$  humano e que compreende SSSYY (SEQ ID NO:2) em CDRH1; SFFYTGSTYYNPSLRS (SEQ ID NO:4) em CDRH2; QSTYYYGSGNYYGWFDR (SEQ ID NO:6) em CDRH3; RASQSVSSYLA (SEQ ID NO:10) em CDRL1; DASNRAT (SEQ ID NO:12) em CDRL2; e QQRSNWPPA (SEQ ID NO:14) em CDRL3.

Preferentemente, o antagonista de PDGFR $\alpha$  é um anticorpo ou um seu fragmento compreendendo um domínio variável de cadeia pesada com

QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSINSSSYWGWLRQSPGKLEWIGSFFY  
 TGSTYYNPSLRSRLTISVDTSKNQFSLMLSSVTAADTAVYYCARQSTYYYGSGNY  
 YGWFDRWDQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 8) ou um domínio variável de cadeia leve com  
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT  
 GIPARFSGSGGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPAFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 16).

Mais preferentemente, o antagonista PDGFR $\alpha$  é um anticorpo ou um seu fragmento compreendendo um domínio variável de cadeia pesada com

QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSINSSSYWGWLRQSPGKLEWIGSFFY  
 TGSTYYNPSLRSRLTISVDTSKNQFSLMLSSVTAADTAVYYCARQSTYYYGSGNY  
 YGWFDRWDQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 8) e um domínio variável de cadeia leve com  
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT  
 GIPARFSGSGGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPAFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 16).

Preferentemente, o antagonista PDGFR $\alpha$  é um anticorpo ou um seu fragmento compreendendo uma cadeia pesada com

MGWSCIIILFLVATATGVHSQLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSINSSSYWG  
 WLRQSPGKGLEWIGSFFYTGSTYYNPSLRSRLTISVDTSKNQFSLMLSSVTAADT  
 AVYYCARQSTYYYGSGNYGWFDNRWDQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS  
 GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS  
 SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK  
 KTDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN\VAVDGVEVI3NAKTKTREEQYNSTY  
 RVVSVLTVLHQDWLNGKJiYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR  
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL  
 TVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:31) e uma  
 cadeia leve com

MGWSCIIILFLVATATGVHSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ  
 QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSN  
 WPPAFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW  
 KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLS  
 SPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:33).

De acordo com outro aspecto da presente invenção, proporciona-se um antagonista PDGFR $\alpha$  para utilização no tratamento de um indivíduo com cancro ósseo metastático, em que o referido antagonista PDGFR $\alpha$  é um anticorpo ou um seu fragmento que é específico para PDGFR $\alpha$  humano, em que o anticorpo ou o fragmento de anticorpo compete pela ligação a PDGFR $\alpha$  com um anticorpo da presente invenção.

Preferentemente, o tumor é metastizado de um cancro da próstata, cancro da mama ou cancro do pulmão.

O antagonista PDGFR $\alpha$  da presente invenção é preferentemente um que inibe a ligação de PDGFR $\alpha$  ou neutraliza PDGFR $\alpha$ .

### **DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

A Figura 1 mostra o crescimento de xeno-enxertos de tumores subcutâneos LuCaP 35V em ratinhos SCID castrados durante um período de tratamento iniciado quando os tumores atingiram 150-200 mm<sup>3</sup>. Paineis A: controlos não tratados; Paineis B: os animais foram tratados durante quatro semanas com docetaxel (tanto 10 mg/kg como 20 mg/kg) isoladamente, ou em combinação com anticorpos anti-IGF-IR (40 mg/kg de IMC-A12); Paineis C: níveis séricos de PSA em ratinhos SCID não tratados e tratados transportando xeno-enxertos subcutâneos de tumores LuCaP 35V. Os ratinhos tratados receberam docetaxel (20 mg/kg) isoladamente ou docetaxel (tanto 10 mg/kg como 20 mg/kg), em combinação com anticorpos anti-IGF-IR (40 mg/kg IMC-A12). O tratamento foi iniciado quando os tumores tinham atingido 150-200 mm<sup>3</sup> e finalizado após quatro semanas.

A Figura 2 mostra suspensões células isoladas de xeno-enxertos de tumores LuCaP 35V tratados com docetaxel (10 mg/kg) isoladamente (Grupo A) ou em combinação com anticorpos anti-IGF-IR (40 mg/kg IMC-A12) (Painel B). O campo denominado R1 corresponde a células apoptóticas com ADN fragmentado (aumento de marcação com FITC).

A Figura 3 mostra a síntese de ADN (absorção de BrDu) nos xeno-enxertos de tumores após suspensão do tratamento com docetaxel (10 mg/kg ou 20 mg/kg) isoladamente, e em combinação com anticorpos anti-IGF-IR (40 mg/kg IMC-A12).

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

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

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

A Figura 7 mostra o efeito do tratamento com um anticorpo anti-IGF-IR (IMC-A12), em PSA produzida por xeno-enxertos em ratinhos SCID enxertados com células LuCaP 23.1.

A Figura 8 mostra uma série de fotografias de

raios-X de ratinhos SCID enxertados com células LuCaP 23.1. Os ratinhos A12 receberam 40 mg/mL de IMC-A12 i.p. três vezes por semana durante seis semanas. As fotografias raios-X foram realizadas no momento do sacrifício.

A Figura 9 mostra níveis de PSA (a) e radiografias representativas (b) de ratinhos SCID com xenoinxertos intratibiais de células de próstata humana LuCaP 23.1.

A Figura 10 representa o efeito de aspirado da medula óssea humana sobre a actividade de Akt nas células cancerosas de próstata. Os lisados celulares foram submetidos a SDS-PAGE. Para a análise "Western blot", as membranas foram marcadas com anticorpos direccionados para fosfo-Akt (Ser-473, Cell Signaling Technology), PDGFR $\alpha$  (R&D Systems) e actina (Sigma). A ligação ao anticorpo primário foi detectada utilizando proteína A ou proteína G conjugada com HRP (Sigma).

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

fosforilação de Akt induzida pelo aspirado de medula óssea, a inibição da fosforilação de Akt induzida pelo aspirado de medula óssea por AG-1296, e a fosforilação de Akt induzida por PDGF-AA + PDGF-BB.

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

A Figura 13 mostra a ligação do anticorpo ao PDGFR $\alpha$ . A: ligação directa de anticorpos anti-PDGFR $\alpha$  ao domínio extracelular imobilizado de PDGFR $\alpha$ . B: inibição da ligação de [<sup>125</sup>I]PDGF-AA a PDGFR $\alpha$  imobilizado.

A Figura 14 mostra a inibição específica da fosforilação de PDGFR $\alpha$  e moléculas efectoras a jusante.

A Figura 15 mostra a inibição da incorporação de [<sup>3</sup>H]timidina estimulada por PDGF-AA em células PAE R $\alpha$  por mAbs.

A Figura 16 mostra a inibição da activação de moléculas efectoras a jusante induzida por PDGF-AA em células SKLMS-5 1 (A) e U118 (B).

A Figura 17 mostra a inibição da incorporação de [<sup>3</sup>H]timidina estimulada por PDGF-AA em células U118 (A) e SKLMS-1 (B) por mAbs. A inibição da incorporação de [<sup>3</sup>H]timidina estimulada por PDGF-BB também é mostrada para células SKLMS-1 (C) e U118 (D).

A Figura 18 mostra efeitos dependentes da dose para o tratamento xeno-enxertos tumorais estabelecidos de U118 (glioblastoma; painel A) e SKLMS-1 (leiomiossarcoma; painel B) em ratinhos imunossuprimidos.

A Figura 19 mostra a redução da fosforilação de PDGFR $\alpha$  *in vivo* em tumores U118 tratados com anticorpo anti-PDGFR $\alpha$ , em comparação com o tratamento com IgG humano não específico.

A Figura 20 ilustra vectores de expressão GS utilizados para a clonagem de genes das regiões variáveis V<sub>H</sub> e V<sub>K</sub> humanas derivadas de hibridoma e a expressão das proteínas de cadeia leve e pesada (IgG1) humanas completas. Os dois vectores foram recombinados como explicado nos Exemplos e o vector combinado foi transfectado em células NS0.

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

A presente divulgação refere-se ao tratamento de tumores ósseos com anticorpos ou fragmentos de anticorpos



que se ligam ao receptor de factor de crescimento I similar à insulina (IGF-IR). A expressão endócrina de IGF-I é primeiramente regulado pela hormona de crescimento e produzida no fígado, mas outros tipos de tecidos também são capazes de expressar IGF-I, incluindo os ossos, que contém uma grande reserva de factores de crescimento. Dependendo do tipo de célula tumoral, IGF-I está envolvida na regulação endócrina, parácrina, e/ou autócrina (Yu, H. e Rohan, J., *J. Natl. Cancer Inst.* 92: 1472-89 (2000)).

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

Também foi descoberto que PDGFR $\alpha$  desempenha um papel importante no crescimento de tumores ósseos. Por exemplo, algumas linhagens de células tumorais que expressam PDGFR $\alpha$  preferencialmente metastizam para o osso. Essas linhagens celulares apresentam um aumento da

activação de PDGFR $\alpha$  e da fosforilação de moléculas sinalizadoras a jusante em resposta aos factores solúveis presentes na medula óssea. A activação de PDGFR $\alpha$  pela medula óssea é reduzida ou completamente inibida por antagonistas de PDGFR $\alpha$ , e a fosforilação de moléculas sinalizadoras a jusante que são comumente activadas por sinalização através de PDGFR $\alpha$  e outros sistemas receptores da tirosina cinase é muito reduzida. Alguns dados sugerem que a via de sobrevivência de PI3K/Akt é activada pela sinalização de PDGFR $\alpha$ , não só por ligandos que activam PDGFR $\alpha$  directamente, mas também por factores presentes na medula óssea que causam a transactivação do receptor.

Os tumores ósseos primários a serem tratados de acordo com a invenção incluem, mas não estão limitados a, osteossarcomas, condrossarcomas, fibrossarcomas, e hemangiossarcomas. Notavelmente, tumores secundários malignos (metastásicos) são muito mais comuns do que os tumores ósseos primários. Os tumores ósseos metastásicos a serem tratados de acordo com a invenção podem surgir a partir de uma variedade de fontes, as mais comuns das quais são cancro da próstata, mama, ou pulmão. A origem de um cancro metastático ósseo geralmente será aparente a partir do histórico do paciente. Os tumores podem ser osteoblásticos ou osteolíticos. Os tumores podem ser dependentes de estimulação de IGF-IR quando eles surgem, ou podem transitar para dependência de IGF-IR. Por exemplo, cancro de próstata ou de metástases de cancro de próstata que são inicialmente hormona/androgénio-dependentes e

controláveis pelos tratamentos físicos ou químicos que suprimem a produção de androgénio ou hormonal, pode tornar-se hormona/androgénio-independentes através do aumento da sensibilidade à estimulação através de IGF-IR. Além disso, além de fornecer o tratamento hormona/androgénio-independente de tumores, a invenção pode ser útil no tratamento de tumores ósseos hormona/androgénio-dependente, sem dependência na supressão do androgénio ou da produção hormonal, por exemplo, através da co-administração de anticorpos IGF-IR com agentes antineoplásicos. Tais tumores incluiriam tumores ósseos metastásicos que são estimulados através de IFG-IR no ambiente rico em IGF do osso, que podem ser sensíveis à estimulação hormonal, mas não o suficientemente sensíveis para crescer sem envolvimento de IGF. A ablação da hormona poderá não ser necessária para tais tumores.

Os tumores ósseos que são dependentes de PDGF também podem ser tratados, assim como tumores que são dependentes da "medula óssea". Os tumores dependentes da medula óssea apresentam activação de PDGFR $\alpha$  em resposta a factores solúveis presentes na medula óssea. Por exemplo, como exemplificado aqui, uma linhagem celular cancerosa metastásica expressando PDGFR $\alpha$  humana sofre a activação de PDGFR $\alpha$  e fosforilação de Akt+ aquando da exposição ao aspirado de medula óssea. Um anticorpo anti-PDGFR $\alpha$  e um antagonista de molécula pequena de PDGFR $\alpha$ , cada um inibem a activação de PDGFR $\alpha$  e a fosforilação de Akt+ na linhagem celular. Os factores solúveis na medula óssea que activam PDGFR $\alpha$  incluem, mas não estão limitados a, PDGF-AA e -BB.

Embora tal dependência da medula óssea envolva a sinalização através de PDGFR $\alpha$ , não pode envolver apenas a ligação da PDGFR $\alpha$  a um ligando PDGFR $\alpha$ . Por exemplo, como exemplificado aqui, deve-se notar que a activação de PDGFR $\alpha$  por ligandos definida (PDGF-AA-ou BB) é mais fraca do que a activação pelo aspirado de medula óssea. Além disso, observa-se que na presença de aspirado de medula óssea, a fosforilação de Akt+ diminui com o aumento do tempo de incubação. No seu conjunto, estes resultados sugerem que além de responder a ligação de PDGFs, PDGFR $\alpha$  pode ser transactivado (fosforilado) por outros elementos de transdução de sinal (por exemplo, outros receptores de tirosina cinase) sensíveis a outros componentes da medula óssea. Em qualquer caso, numa linhagem celular adequada para o crescimento do osso metastizado (isto é, uma linhagem celular que preferencialmente metastiza no osso), a activação de PDGFR $\alpha$  dependente da medula óssea é observada, a qual é inibida por antagonistas de PDGFR $\alpha$ . Além disso, o tratamento com um antagonista de PDGFR $\alpha$  inibe a estimulação induzida pela medula óssea da via anti-apoptótica de PI3K/Akt e da proteína cinase activada pelo mitogénio (MAPK).

Os tumores ósseos a serem tratados com um antagonista de PDGFR $\alpha$  podem surgir como metástases de células do cancro da próstata, e, como referido, podem ser dependentes de hormona/androgénio, ou terem feito a transição para independência de hormona/androgénio. Tais

tumores também podem surgir como metástases de cancro que não o de próstata. Alguém versado na técnica poderia facilmente ser capaz de diagnosticar tais condições e distúrbios usando testes convencionais conhecidos.

Tratamento significa qualquer tratamento de uma doença num animal e inclui: (1) impedir que a doença ocorra num mamífero que pode ter predisposição para a doença, mas ainda não experimenta ou apresenta sintomas da doença; por exemplo, a prevenção do surgimento de sintomas clínicos; (2) a inibição da doença, como por exemplo, interromper o seu desenvolvimento; ou (3) alívio da doença, como por exemplo, causando regressão dos sintomas da doença. A inibição do crescimento tumoral inclui retardar ou interromper o crescimento, bem como causar regressão tumoral. Uma quantidade eficaz para o tratamento de uma doença significa aquela quantidade que, quando administrada a um mamífero que dela necessite, é suficiente para conseguir o tratamento, conforme acima definido, para aquela doença. Os antagonistas de IGF-IR e o antagonista de PDGFR $\alpha$  podem ser administrados em isoladamente, em combinação com outro, ou em combinação com um ou mais agentes antineoplásicos, como, por exemplo, um agente quimioterapêutico ou radiológico.

Pode ser desejável determinar o nível de expressão de IGF-IR e/ou PDGFR $\alpha$  num tumor a ser tratado. Nesses casos, podem ser recolhidas biopsias tumorais e analisadas por métodos bem conhecidos na técnica. Um

antagonista de IGF-IR ou antagonista de PDGFR $\alpha$  é administrado com base no facto do receptor correspondente ser normalmente expresso ou activado num tipo de tumor particular ou invariavelmente torna-se expresso ou activado à medida que a doença progride.

Um antagonista de IGF-IR pode ser um antagonista extracelular ou um antagonista intracelular e mais do que um antagonista pode ser empregado. Os antagonistas extracelulares incluem, mas não estão limitados a proteínas ou outras moléculas biológicas que se ligam a IGF-IR ou a um ou mais dos seus ligandos (por exemplo, IGF-I e IGF-II são ligandos naturais de IGF-IR). Um antagonista extracelular inibe a ligação do IGF-IR aos seus ligandos. O antagonista é um anticorpo anti-IGF-IR, como, por exemplo, IMC-A12. O antagonista é um fragmento de IGF-IR solúvel de ligação ao ligando. Os antagonistas de IGF-IRs intracelulares podem ser moléculas biológicas, mas são geralmente moléculas pequenas. Exemplos incluem, mas não estão limitados a, inibidor AG1024 de tirosina cinase (Calbiochem), inibidor de cinase do receptor do factor de crescimento-I do tipo insulina NVP-AEW541 (Novartis), e inibidor de receptor de factor de crescimento-I/insulina similar à insulina BMS-554417 (Bristol Myers Squibb). Será apreciado que uma molécula pequena útil para ser utilizada na invenção são inibidores de IGF-IR, mas não precisam ser totalmente específicos para IGF-IR.

Os anticorpos anti-IGF-IR a serem utilizados de

acordo com a presente divulgação apresentam uma ou mais das seguintes propriedades:

1) Os anticorpos ligam-se ao domínio externo do IGF-IR e inibem a ligação do IGF-I ou IGF-II a IGF-IR. A inibição pode ser determinada, por exemplo, através de um ensaio de ligação directa utilizando receptores purificados ou ligados à membrana. Na presente realização, os anticorpos ou os seus fragmentos ligam-se de preferência a IGF-IR, pelo menos tão fortemente quanto os ligandos naturais de IGF-IR (IGF-I e IGF-II).

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

A neutralização de IGF-IR inclui inibição, diminuição, inactivação e/ou ruptura de uma ou mais dessas actividades normalmente associadas com transdução de sinal. A neutralização pode ser determinada *in vivo*, *ex vivo*, *in vitro* ou utilizando, por exemplo, tecidos, células cultivadas, ou componentes celulares purificados. A neutralização inclui a inibição de heterodímeros de IGF-IR/IR bem como homodímeros de IGF-IR. Assim, a neutralização de IGF-IR tem vários efeitos, incluindo a inibição, diminuição, inactivação e/ou ruptura do crescimento (proliferação e diferenciação), angiogénese (recrutamento, invasão e metás-

tase do vaso sanguíneo), e motilidade e metástase celular (adesão e invasividade celular).

Uma medida de neutralização de IGF-IR é a inibição da actividade do receptor tirosina cinase. A inibição de tirosina cinase pode ser determinada usando métodos bem conhecidos; por exemplo, através da medição do nível de autofosforilação de receptor de cinase recombinante, e/ou fosforilação de substratos naturais ou sintéticos. Assim, os ensaios de fosforilação são úteis na determinação de anticorpos de neutralização no contexto da presente invenção. A fosforilação pode ser detectada, por exemplo, usando um anticorpo específico para fosfotirosina num ensaio ELISA ou num "Western blot". Alguns ensaios da actividade de tirosina cinase são descritos em Panek et al., *J. Pharmacol. Exp. Thera.* 283: 1433-44 (1997) e Batley et al., *Life Sci.* 62: 143-50 (1998). Os anticorpos da invenção provocam uma diminuição na fosforilação de tirosina IGF-IR de, pelo menos, cerca de 75%, de preferência, pelo menos, cerca de 85%, e preferencialmente, pelo menos, cerca de 90% nas células que respondem ao ligando.

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



Além disso, os métodos de detecção de expressão de proteínas podem ser utilizados para determinar a neutralização de IGF-IR, em que as proteínas sendo medidas são reguladas pela actividade de tirosina cinase de IGF-IR. Estes métodos incluem imuno-histoquímica (IHC) para a detecção de expressão de proteínas, hibridização de fluorescência *in situ* (FISH) para detecção da amplificação de genes, ensaios de ligação competitiva de radioligandos, técnicas de "blotting" de matriz sólida, tais como a "Northern" e "Southern blots", reacção de cadeia de polimerase de transcriptase reversa (RT-PCR) e ELISA. Ver, por exemplo, Grandis et al., *Cancer*, 78: 1284-92 25 (1996); Shimizu et al., *Japan J. Cancer Res.*, 85: 567-71 (1994); Sauter et al., *Am. J. Path.*, 148: 1047-53 (1996); Collins, *Glia* 15: 289-96 (1995); Radinsky et al., *Clin. Cancer Res.* 1: 19-31 (1995); Petrides et al., *Cancer Res.* 50: 3934-39 (1990); Hoffmann et al., *Anticancer Res.* 17: 4419-26 (1997); Wikstrand et al., *Cancer Res.* 55: 3140-48 (1995).

Ensaio *ex vivo* podem também ser utilizados para determinar a neutralização de IGF-IR. Por exemplo, a inibição dos receptores de tirosina cinase pode ser observada por ensaios mitogénicos utilizando linhagens celulares estimuladas com ligandos do receptor na presença e ausência de inibidor. A linhagem celular de cancro de mama MCF7 (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD) é uma linhagem celular tal que expressa IGF-IR e é estimulada por IGF-I ou IGF-II. Outro método envolve testes de inibição do crescimento de células tumorais que

expressam IGF-IR ou células transfectadas para expressar IGF-IR. A inibição também pode ser observada usando modelos tumorais, por exemplo, células tumorais humanas injectadas num ratinho.

Os anticorpos não são limitados por qualquer mecanismo particular de neutralização de IGF-IR. Os anticorpos anti-IGF-IR podem se ligar externamente a receptores de IGF-IR de superfície celular, bloquear a ligação do ligando (por exemplo, IGF-I ou IGF-II) e a subsequente transdução de sinal mediada por receptores associados a tirosina cinase, e evitar a fosforilação do IGF-IR e de outras proteínas a jusante na cascata de transdução de sinal.

3) Os anticorpos causam modulação negativa de IGF-IR. A quantidade de IGF-IR presente na superfície de uma célula depende da produção, internalização e degradação de receptores de proteína. A quantidade de IGF-IR presente à superfície de uma célula pode ser medida indirectamente, pela detecção da internalização do receptor ou de uma molécula ligada ao receptor. Por exemplo, a internalização do receptor pode ser medida pelo contacto com células que expressam IGF-IR com um anticorpo marcado. O anticorpo ligado à membrana é então retirado, recolhido e contado. O anticorpo internalizado é determinado pela lise das células e pela detecção do marcador nos lisados.

Outra maneira é medir directamente a quantidade

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

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

Outra medida da modulação negativa é a redução da proteína receptora total presente numa célula, e reflecte a degradação dos receptores internos. Consequentemente, o tratamento de células (particularmente células cancerosas), com anticorpos resulta numa redução no total de células IGF-IR. Num aspecto preferido, a redução é, no mínimo,

cerca de 70%, preferentemente, pelo menos, cerca de 80%, e ainda mais preferentemente, pelo menos, cerca de 90%.

Para o tratamento de seres humanos, os anticorpos são preferencialmente humanos. Alternativamente, os anticorpos podem ser de primatas não humanos ou de outros mamíferos, ou podem ser anticorpos humanizados ou quiméricos. Um anticorpo anti-IGF-IR compreende uma, duas, três, quatro, cinco, e/ou seis regiões determinantes de complementaridade (CDRs) seleccionadas do grupo constituído por SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, e SEQ ID NO: 49 (CDR1H, CDR2H, CDR3H, CDR1L, CDR2L, CDR3L, respectivamente). O anticorpo anti-IGF-IR compreende uma, duas, três, quatro, cinco, e/ou seis regiões determinantes de complementaridade (CDRs) seleccionadas do grupo constituído por SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, e SEQ ID NO: 59 (CDR1H, CDR2H, CDR3H, CDR1L, CDR2L, CDR3L, respectivamente). De preferência, os anticorpos (ou seus fragmentos) têm CDRs de cadeia pesada de SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37 e SEQ ID NO: 39. Alternativamente, e também de preferência, os presentes anticorpos incluindo os seus fragmentos, têm CDRs de cadeia leve de SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47 e SEQ ID NO: 49 ou SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57 e SEQ ID NO: 59. Um desses anticorpos anti-IGF-IR é o anticorpo IgG1 humano IMC-A12 (WO2005016970), com um domínio variável de cadeia pesada representado por SEQ ID NO: 41 e um domínio variável de cadeia leve representado por SEQ ID NO: 51. Outro anticorpo humano preferido é IMC-2F8 (WO2005016970), com um domínio variável de cadeia

pesada idêntico ao IMC-A12 e um domínio variável de cadeia leve representado por SEQ ID NO: 61. Anticorpos úteis ainda incluem anticorpos anti-IGF-IRs que competem com MC-A12 ou IMC-2F8 para ligação a IGF-IR, bem como anticorpos que se ligam a outros epitopos (ou seja, anticorpos que se ligam a outros epitopos e exibem propriedades como anteriormente descritas como bloqueio do ligando, internalização do receptor, etc, mas não competem com IMC-A12 ou IMC-2F8).

Antagonistas de PDGFR $\alpha$  também podem ser usados para o tratamento. O antagonista de PDGFR $\alpha$  pode ser um antagonista extracelular ou um antagonista intracelular e mais de um antagonista podem ser empregues. Antagonistas extracelulares incluem, mas não estão limitados a, proteínas ou outras moléculas biológicas que se ligam a PDGFR $\alpha$  ou um ou mais dos seus ligandos (por exemplo, PDGF-AA, -AB, -BB, -CC). Um antagonista extracelular inibe a ligação do PDGFR $\alpha$  aos seus ligandos. Num aspecto, o antagonista é um anticorpo anti-PDGFR $\alpha$ , como, por exemplo, IMC-3G3. Noutro aspecto, a proteína de ligação é um fragmento de PDGFR $\alpha$  solúvel de ligação ao ligando. Os antagonistas intracelulares de IGF-IRs podem ser moléculas biológicas, mas são geralmente moléculas pequenas. Num aspecto, o antagonista intracelular de PDGFR $\alpha$  é AG1296. AG1296 (Calbiochem) é um inibidor de PDGF $\alpha$  a, PDGF $\beta$ s, e c-KIT, e também reage com Flt3. Outras moléculas pequenas dirigidas para PDGFRs incluem STI-571 (mesilato de imatinib, Gleevec®, Novartis) e SU11248 (malato de sunitinib, SUTENT®, Pfizer).

Um anticorpo anti-PDGFR $\alpha$  compreende uma, duas, três, quatro, cinco, e/ou seis regiões determinantes de complementaridade (CDRs) seleccionadas do grupo constituído por SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, e SEQ ID NO: 14 (CDR1H, CDR2H, CDR3H, CDR1L, CDR2L, CDR3L, respectivamente). De preferência, os anticorpos (ou seus fragmentos) têm CDRs de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 6. Alternativamente, e também de preferência, os presentes anticorpos, ou seus fragmentos, têm CDRs de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 14. As sequências de aminoácidos da CDRs são definidas abaixo na Tabela 1.

---

Tabela 1 - CDRs de IMC-3G3

Cadeia Pesada

CDR1	SSSY	SEQ ID NO: 2
CDR2	SFFYTGSTYYNPSLRS	SEQ ID NO: 4
CDR3	QSTYYYGSGNYYGWFDR	SEQ ID NO: 6

Cadeia Leve

CDR1	RASQSVSSYLA	SEQ ID NO: 10
CDR2	DASNRAT	SEQ ID NO: 12
CDR3	QQRSNWPPA	SEQ ID NO: 14

---

Noutro aspecto, o anticorpo anti-PDGFR $\alpha$ , ou seu fragmento, tem uma região variável de cadeia pesada humana de SEQ ID NO: 8 e/ou de uma região variável humana de cadeia leve de SEQ ID NO: 16. IMC-3G3 é um anticorpo tal e é exemplificado na presente divulgação.

Preferentemente, os anticorpos, ou seus fragmentos neutralizam PDGFR $\alpha$ . A ligação de um ligando, por exemplo, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB ou PDGF-CC, a um domínio extracelular de PDGFR $\alpha$  estimula a dimerização do receptor, a autofosforilação, a activação do domínio interno citoplasmático do receptor da tirosina cinase, e início de diversas vias de transdução de sinal e transactivação envolvidas na regulação da síntese do ADN (activação genética) e progressão do ciclo celular ou divisão. As anticorpos anti-PDGFR $\alpha$  tipicamente bloqueiam a ligação aos ligandos e/ou dimerização do receptor, e inibem uma ou mais de autofosforilação, activação da actividade de tirosina cinase e transdução de sinal. Os anticorpos anti-PDGFR $\alpha$  podem ser específicos para a região de ligação ao ligando extracelular de PDGFR $\alpha$  e impedir a ligação de um ligando de PDGFR $\alpha$ . De preferência, esses anticorpos anti-PDGFR $\alpha$ , ou seus fragmentos, ligam-se a PDGFR $\alpha$ , pelo menos tão fortemente como os ligandos naturais de PDGFR $\alpha$ . Alternativamente ou adicionalmente, os anticorpos podem ser específicos para uma região do monómero receptor que, de outra formaria um dímero receptor de interface. Tais anticorpos bloqueiam a formação de dímero, embora a ligação de ligando a um monómero receptor pode ou não ser bloqueada.

Como descrito acima para os anticorpos anti-IGF-IRs, a neutralização de receptor pode ser determinada por uma variedade de métodos *in vivo*, *in vitro*, e *ex vivo*. Os anticorpos anti-PDGFR $\alpha$  reduzem a fosforilação de PDGFR $\alpha$  em, pelo menos, cerca de 75%. Noutro aspecto, a fosfo-

rilação é reduzida em, pelo menos, cerca de 85% ou, pelo menos, cerca de 90%. Como resultado da inibição da transdução do sinal de PDGFR $\alpha$ , a fosforilação ou um componente da via de transdução de sinal a jusante (por exemplo, Akt, p42/p44, etc) é reduzida em, pelo menos, cerca de 40%, pelo menos, cerca de 60%, ou, pelo menos, cerca de 80%. A neutralização do receptor pode ser determinada utilizando ligandos definidos (por exemplo, PDGF-AA, -AB, -BB, -CC), misturas de tais ligandos, ou preparações, tais como aspirado de medula óssea que compreendem PDGFs, bem como de outros factores de crescimento estimuladores.

A neutralização de PDGFR $\alpha$  inclui a inibição, diminuição, inactivação e/ou ruptura de uma ou mais dessas actividades normalmente associadas com a transdução de sinal. Assim, neutralizar PDGFR $\alpha$  tem vários efeitos, incluindo a inibição, diminuição, inactivação e/ou perturbações do crescimento (proliferação e diferenciação), da angiogénese (recrutamento, invasão e metástases do vaso sanguíneo), motilidade e metástase celular (adesão e invasividade celular).

Ensaio *ex vivo*, como descritos acima, também podem ser utilizados para determinar a neutralização de PDGFR. Por exemplo, células de leiomiossarcoma SKLMS-1 (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD; ATCC HTB-88™), ou células de glioblastoma U118 (ATCC HTB-15™) humanas estimuladas com PDGF-AA podem ser utilizadas para a avaliação da inibição de PDGFR $\alpha$ . A inibição do



crescimento pode ser determinada utilizando células tumorais humanas expressando PDGFR $\alpha$  injectadas num ratinho SCID.

A presente divulgação não está limitada por qualquer mecanismo particular de neutralização de PDGFR $\alpha$ . Os anticorpos anti-PDGFR $\alpha$  ligam-se externamente ao receptor de superfície celular PDGFR $\alpha$ , bloqueiam a ligação do ligando (por exemplo, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC), inibem a fosforilação de PDGFR $\alpha$ , inibem a transdução de sinal mediada através da tirosina cinase associada ao receptor, e modulam a actividade de componentes de tradução de sinal a jusante. O complexo receptor-anticorpo também pode ser internalizado e degradado, resultando na regulação negativa do receptor de superfície celular. As metaloproteinases de matriz, que funcionam na invasão e metástase da célula tumoral, que também podem ter regulação negativa pelos anticorpos. Além disso, os anticorpos podem apresentar inibição da produção do factor de crescimento e a angiogénese.

Como descrito acima, os antagonistas de PDGFR $\alpha$ s são úteis para o tratamento dos tumores ósseos, incluindo tumores ósseos metastásicos. Outros tipos de tumores que expressam PDGFR $\alpha$  e podem ser tratados de acordo com a invenção incluem, mas não estão limitados a, tumores do ovário, tumores de mama, tumores pulmonares, tumores hepatocelulares, tumores estromais gastrointestinais, melanoma, carcinoma das células renais, tumores de próstata, e

sarcomas dos tecidos moles. Os sarcomas dos tecidos moles são originários de tecidos tais como gordura, músculos, nervos, tendões e vasos sanguíneos e linfáticos. Tipicamente, as células tumorais sobre-expressam PDGFR $\alpha$ . A expressão de PDGFR $\alpha$  pode ser determinada, por exemplo, através da análise histoquímica ou de ARN. Por exemplo, uma análise de Scatchard de ligação de IMC-3G3 marcado radioativamente a células U118 e células tumorais SKLMS-1 indica que o número de moléculas de PDGFR $\alpha$  nas células é de cerca de 500 e 2500, respectivamente.

Os antagonistas de PDGFR $\alpha$  funcionam inibindo a transdução de sinal por PDGFR $\alpha$  expresso nas próprias células tumorais, ou pela inibição de PDGFR $\alpha$  expresso em células estromais circundantes que de outro modo sofrem estimulação paracrina por PDGFs expressos de células tumorais. Assim, anticorpos, como IMC-3G3 e outros antagonistas de PDGFR $\alpha$ s são úteis para o tratamento dos tumores caracterizados por estimulação autócrina e/ou parácrina de PDGFR $\alpha$ .

Fragmentos de anticorpos podem ser produzidos clivando um anticorpo inteiro, ou por expressão de ADN que codifica para o fragmento. Fragmentos de anticorpos podem ser preparados por métodos descritos por Lamoyi et al., *J. Immunol. Methods*, 56: 235-243 (1983) e por Parham, *J. Immunol.* 131: 2895-2902 (1983). Tais fragmentos podem conter um ou ambos os fragmentos Fab ou o fragmento F(ab')<sub>2</sub>. Esses fragmentos podem também conter anticorpos de

região variável de fragmento de cadeia simples, isto é, scFv, diacorpos, ou outros fragmentos de anticorpos. Métodos de produção de tais equivalentes funcionais são divulgados no Pedido PCT WO 93/21319, Pedido de Patente Europeia No. EP 239400; Pedido PCT WO 89/09622; Pedido de Patente Europeia No. EP 338745; e Pedido de Patente Europeia No. EP 332424.

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

Sempre que for desejado expressar um gene construído em levedura, uma selecção genética adequada para uso na levedura é o gene *trp1* presente no plasmídeo de levedura YRp7. Stinchcomb et al. *Nature*, 282: 39 (1979); Kingsman et al., *Gene*, 7: 141 (1979). O gene *trp1* proporciona um marcador de selecção para uma estirpe mutante de levedura sem a capacidade de crescer em triptofano, por exemplo, ATCC No. 44076 25 ou PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85: 12 (1977). A presença da lesão *trp1* no genoma da célula hospedeira de levedura proporciona então um meio eficaz para detectar a transformação pelo crescimento na ausência de triptofano. Do mesmo modo,

estirpes de levedura deficientes em Leu2 (ATCC 20622 ou 38626) são complementadas por plasmídeos conhecidos que contêm o gene Leu2.

As células hospedeiras transformadas são cultivadas por métodos conhecidos na técnica num meio líquido contendo fontes de carbono assimiláveis (hidratos de carbono, como a glucose ou a lactose), azoto (aminoácidos, péptidos, proteínas ou os seus produtos de degradação, como peptonas, sais de amónio ou similares), e sais inorgânicos (sulfatos, fosfatos e/ou carbonatos de sódio, potássio, magnésio e cálcio). O meio ainda contém, por exemplo, substâncias promotoras do crescimento, tais como oligoelementos, por exemplo, ferro, zinco, manganês e similares.

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

Os anticorpos e fragmentos dos anticorpos podem

ser obtidos, por exemplo, a partir de anticorpos de ocorrência natural, ou bibliotecas de apresentação de fagos Fab ou scFv. Entende-se que, para fazer um anticorpo de domínio único a partir de um anticorpo que inclua um domínio  $V_H$  e  $V_L$ , certas substituições de aminoácidos fora das CDRs podem ser pretendidas para reforçar a ligação, expressão ou solubilidade. Por exemplo, pode ser desejável modificar resíduos de aminoácidos que de outra forma seriam enterrados na interface  $V_H$ - $V_L$ .

Além disso, anticorpos e fragmentos de anticorpos podem ser obtidos por tecnologia convencional de hibridomas (Harlow & Lane, ed., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, 211-213 (1998)) utilizando ratinhos transgênicos (por exemplo, ratinhos KM de Medarex, San José, na Califórnia), que produzem as cadeias pesada gama e leve kapa da imunoglobulina humana. Num aspecto preferida, uma porção substancial do genoma de produção de anticorpos humanos é inserido no genoma do ratinho, e é tornado deficiente na produção de anticorpos murinos endógenos. Tais ratinhos podem ser imunizados por via subcutânea (s.c.), com PDGFR $\alpha$  (normalmente em adjuvante de Freund completo), com reforços conforme necessário. Os métodos de imunização são bem conhecidos na técnica.

A proteína usada para identificar a ligação de IGF-IR aos anticorpos é preferencialmente IGF-IR e, ainda mais de preferência, é o domínio extracelular do IGF-IR. A proteína usada para identificar anticorpos que se ligam a

PDGFR $\alpha$  é preferencialmente PDGFR $\alpha$  e, ainda mais preferentemente, é o domínio extracelular de PDGFR $\alpha$ . Tais domínios extracelulares pode ser livres ou conjugados com outras moléculas.

A presente divulgação fornece também polinucleótidos isolados que codificam para os anticorpos, ou seus fragmentos, descritos anteriormente. Detalhes do anticorpo IMC-A12 de anti-IGF-IRs são divulgados em WO2005016970. A Tabela 2 expõe as sequências de ácidos nucleicos para MC-3G3.

---

Tabela 2 - Sequências de nucleótidos que codificam para CDRs de IMC-3G3

Cadeia Pesada

CDR1	agtagtagtt actac	SEQ ID NO: 1
CDR2	agtttctttt atactgggag cacctactac aaccggtccc tcaggagt	SEQ ID NO: 3
CDR3	cagtccacgt attactatgg ttgggggaat tattatggct ggttcgaccg c	SEQ ID NO: 5

Cadeia Leve

CDR1	agggccagtc agagtgttag cagctactta gcc	SEQ ID NO: 9
CDR2	gatgcatcca acagggccac t	SEQ ID NO: 11
CDR3	cagcagcgta gcaactggcc tccggcg	SEQ ID NO: 13

---

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

As fontes adequadas de ADNs que codificam para fragmentos de anticorpos incluem qualquer célula, tais como células de hibridoma e baço, que expressam o anticorpo completo. Os fragmentos podem ser utilizados por si só como anticorpos equivalentes, ou podem ser recombinados em equivalentes, tal como descrito acima. As deleções e recombinações de ADN descritas nesta seção podem ser realizadas por métodos conhecidos, tais como os descritos nas publicações acima listadas no que se refere aos equivalentes de anticorpos e/ou outra técnica convencional de ADN recombinante, tais como as descritas a seguir. Outra fonte de ADNs são os anticorpos de cadeia simples produzidos a partir de uma biblioteca de apresentação de fagos, como é conhecido na técnica.

Além disso, a presente divulgação proporciona vectores de expressão contendo as sequências polinucleotídicas anteriormente descritas operativamente ligadas a uma sequência de expressão, uma sequência promotora e uma potenciadora. Uma variedade de vectores de expressão para a síntese eficaz de polipéptidos anticorpos em procariotas, tais como bactérias e sistemas eucarióticos, incluindo, mas não limitado a, sistemas de cultura de leveduras e de células de mamíferos foram desenvolvidas. Os vectores da presente divulgação podem incluir segmentos de sequências de ADN cromossómico, não-cromossómico e sintético.

Qualquer vector de expressão adequado pode ser usado. Por exemplo, vectores de clonagem procariotas

incluem plasmídeos de *E. coli*, como *colE1*, *pCR1*, *pBR322*, *pMB9*, *pUC*, *pKSM*, e *RP4*. Vectores procariotas também incluem derivados de ADN de fago tais como *M13* e outros fagos de ADN de uma única cadeia. Um exemplo de um vector útil em levedura é um plasmídeo 2 $\mu$ . Vectores de expressão adequados para células de mamíferos incluem derivados bem conhecidos de SV40, adenovírus, sequências de ADN derivadas de retrovírus e vectores "shuttle" derivados da combinação de vectores funcionais de mamíferos, tais como aqueles descritos acima, e plasmídeos funcionais e ADN de fago.

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

Os vectores de expressão úteis na presente divulgação contêm pelo menos uma sequência de expressão controlo que é operativamente ligada à sequência de ADN ou fragmento a ser expresso. A sequência controlo é inserida no vector, de modo a controlar e regular a expressão da



sequência clonada de ADN. Exemplos de sequências de expressão de controlo úteis são o sistema *lac*, o sistema *trp*, o sistema *tac*, o sistema *trc*, as regiões principais operadoras e promotoras do fago lambda, a região de controlo fd de proteína de revestimento, os promotores glicolíticos de leveduras, por exemplo, o promotor para 3-fosfoglicerato cinase, os promotores de ácido fosfatase de levedura, por exemplo, Pho5, os promotores de factores cruzamento alfa de levedura, e promotores derivados de polioma, adenovírus, retrovírus, e vírus símios, por exemplo, promotores prematuros e tardios ou SV40, e outras sequências conhecidas por controlarem a expressão de genes de procariotas ou células eucarióticas e seus vírus ou combinações dos mesmos.

A presente divulgação fornece também células hospedeiras recombinantes contendo os vectores de expressão descritos anteriormente. Anticorpos podem ser expressos em linhagens celulares diferentes de hibridomas. Ácidos nucleicos, que compreendem uma sequência que codifica para um polipéptido podem ser usados para transformação de uma célula hospedeira mamífera adequada.

Linhagens celulares de especial preferência são seleccionadas com base no elevado nível de expressão, expressão constitutiva da proteína de interesse e contaminação mínima de proteínas do hospedeiro. As linhagens celulares de mamífero disponíveis como hospedeiras para expressão são bem conhecidas na técnica e

incluem muitas linhagens celulares imortalizadas, tais como, mas não limitadas a, células NS0 de ovário de hamster Chinês (CHO), células de rim de hamster bebê (BHK) e muitas outras. Células eucariotas adicionais adequado incluem leveduras e outros fungos. Hospedeiros procariotas úteis incluem, por exemplo, *E. coli*, tais como *E. coli* SG-936, *E. coli* MP 101, *E. coli* W3110, *E. coli* X1776, *E. coli* X2282, *E. coli* DHI, e *E. coli* MRC1, *Pseudomonas*, *Bacillus*, tais como *Bacillus subtilis*, e *Streptomyces*.

Estas células hospedeiras recombinantes presentes podem ser utilizadas para produzir um anticorpo, ou seu fragmento, cultivando as células, em condições que permitam a expressão do anticorpo ou seu fragmento e purificar o anticorpo ou seu fragmento a partir da célula hospedeira ou do meio em torno da célula hospedeira. O direcionamento do anticorpo ou fragmento expresso para secreção nas células hospedeiras recombinantes pode ser facilitado pela inserção de uma sequência que codifica para um peptídeo líder sinal ou secretor (ver, Shokri et al., Appl Microbiol Biotechnol. 60(6): 654-664 (2003), Nielsen et al., Prot. Eng. 10: 1-6 (1997) e von Heinje et al., Nucl. Acids Res. 14: 4683-4690 (1986)), na extremidade 5' do gene que codifica para o anticorpo de interesse. Estes elementos peptídicos líder secretores podem ser obtidos a partir de sequências quer de procariotas ou de eucariotas. Assim sendo adequadamente, peptídicos líder secretores são utilizados, sendo aminoácidos ligados à extremidade N-terminal de um polipeptídeo para direcionar o movimento do polipeptídeo para fora do citossol da célula hospedeira e secreção para o meio.

Os anticorpos desta divulgação podem ser fundidos a resíduos de aminoácido adicionais. Tais resíduos de aminoácidos podem ser um péptido marcador, talvez para facilitar o isolamento. Outros resíduos de aminoácidos para direccionar os anticorpos para órgãos ou tecidos específicos são também contemplados.

Noutro aspecto, um anticorpo da presente divulgação é feito pela expressão de um ácido nucleico que codifica para o anticorpo num animal transgénico, de tal forma que o anticorpo é expresso e pode ser recuperado. Por exemplo, os anticorpos podem ser expressos num tecido específico de modo que facilite a recuperação e purificação. Numa destes aspectos, um anticorpo da invenção é expresso na glândula mamária de secreção durante o aleitamento. Animais transgénicos, incluem, mas não estão limitados a ratinhos, cabra, e coelho.

Anticorpos que podem ser usados incluem imunoglobulinas completas, fragmentos de imunoglobulinas de ligação a antigénio, bem como proteínas de ligação ao antigénio que compõem domínios de ligação a antigénio de imunoglobulinas. Fragmentos de imunoglobulinas de ligação a antigénio incluem, por exemplo, Fab, Fab', e F(ab')<sub>2</sub>. Outros formatos de anticorpos foram desenvolvidos que mantêm a especificidade de ligação, mas possuem outras características, que podem ser desejáveis, incluindo, por exemplo, biespecificidade, multivalência (mais de dois

sítios de ligação), tamanho compacto (por exemplo, domínios de ligação isolados).

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

Múltiplos anticorpos de cadeia única, cada um com uma única cadeia  $V_H$  e um domínio  $V_L$  covalentemente ligado por um primeiro péptido ligante, pode ser covalentemente ligado, pelo menos, por um ou mais péptido ligante para formar um anticorpo multivalente de cadeia única, que pode ser monoespecífico ou multiespecífico. Cada cadeia de um anticorpo de cadeia única multivalente inclui um fragmento variável de cadeia leve e um fragmento variável de cadeia pesada, e está ligada por um péptido ligante para pelo

menos uma outra cadeia. O péptido ligante é composto de, pelo menos, quinze resíduos de aminoácidos. O número máximo de resíduos de aminoácidos é de cerca de cem. Dois anticorpos de cadeia única podem ser combinados para formar uma diacorpo, também conhecido como um dímero bivalente. Diacorpos têm duas cadeias e dois locais de ligação, e podem ser monoespecíficos ou biespecíficos. Cada cadeia de diacorpo inclui um domínio  $V_H$  ligado a um domínio  $V_L$ . Os domínios são ligados com ligantes que são suficientemente curtos para evitar emparelhamento entre domínios na mesma cadeia, assim dirigindo o emparelhamento entre os domínios complementares em diferentes cadeias de recriar os dois locais de ligação a antigénios.

Três anticorpos de cadeia única podem ser combinados para formar triacorpos, conhecidos também como trímeros trivalentes. Triacorpos são construídos com a extremidade de aminoácido de um domínio  $V_L$  ou  $V_H$  directamente fundidos à extremidade carboxilo de um domínio  $V_L$  ou  $V_H$ , ou seja, sem qualquer sequência ligante. O triacorpo tem três cabeças  $F_v$  com os polipéptidos arranjados de um modo cíclico, de cabeça-a-cauda. Uma possível conformação do triacorpo é planar com os três locais de ligação localizados num plano num ângulo de 120 graus entre si. Os triacorpos podem ser monoespecíficos, biespecíficos ou triespecíficos.

Assim, anticorpos da presente divulgação e seus fragmentos desse incluem, mas não estão limitados a,

anticorpos que ocorrem naturalmente, fragmentos bivalentes tais como (Fab')<sub>2</sub>, fragmentos monovalentes tais como Fab, anticorpos de cadeia única, Fv (scFV) de cadeia única), anticorpos de domínio único, anticorpos de cadeia única multivalentes, diacorpos, triacorpos, e semelhantes que se ligam especificamente aos antigénios.

Os anticorpos anti-IGF-IR e anti-PDGFR $\alpha$  ou fragmentos de anticorpos, que podem ser internalizados mediante ligação a células com IGF-IR (WO2005016970) ou PDGFR $\alpha$ , podem ser quimicamente ou biossinteticamente ligados a agentes anti-tumorais. Agentes anti-tumorais ligados a este tipo de anticorpos incluem quaisquer agentes que destroem ou danificam um tumor ao qual o anticorpo se ligou ou no ambiente da célula ao qual o anticorpo se ligou. Por exemplo, um agente anti-tumoral é um agente tóxico, como um agente quimioterapêutico ou um radioisótopo. Agentes quimioterapêuticos adequados são conhecidos pelos peritos na técnica e incluem antraciclinas (ex. daunomicina e doxorubicina), metotrexato, vindesina, neocarzinostatina, cis-platina, clorambucil, arabinósido de citosina, 5-fluoruridina, melfalano, rícino e caliqueamicina. Os agentes quimioterapêuticos são conjugados com o anticorpo utilizando métodos convencionais (Ver, por exemplo, Hermentin e Seiler, *Behring Inst. Mitt.* 82: 197-215 (1988)).

Radioisótopos adequados para uso como agentes anti-tumorais também são conhecidos por aqueles peritos na

técnica. Por exemplo, usa-se  $^{131}\text{I}$  ou  $^{211}\text{At}$ . Esses isótopos são ligados ao anticorpo utilizando técnicas convencionais (Ver, por exemplo, Pedley et al., *Br. J. Cancer* 68, 69-73(1993)).

Alternativamente, o agente anti-tumoral que está ligado ao anticorpo é uma enzima que activa um profármaco. Desta forma, um profármaco é administrado que permanece na sua forma inactiva até que atinja o local alvo no qual é convertido para sua forma de citotoxina. Na prática, o conjugado anticorpo-enzima é administrado ao paciente e deixa-se localizar na região do tecido a ser tratado. O profármaco é então administrado ao paciente, para que a conversão para o fármaco citotóxico ocorra na região do tecido a ser tratado.

Outros agentes anti-tumorais incluem citocinas, como interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4) ou factor de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). O anticorpo direcciona a citocina para o tumor, de modo que a citocina medeie os danos ou a destruição dos tecidos tumorais sem afectar outros tecidos. A citocina pode ser conjugada com o anticorpo ADN, utilizando técnicas convencionais de ADN recombinante.

Em certos aspectos, os anticorpos anti-IGF-IR ou anti-PDGFR $\alpha$  são administrados em combinação com um ou mais agentes antineoplásicos. Para exemplos de terapias de combinação, ver, por exemplo, Patente U.S. no. 6,217,866

(Schlessinger et al.) (Anti-EGFR antibodies in combination with anti-neoplastic agents); WO 99/60023 (Waksal et al.) (Anti-EGFR antibodies in combination with radiation). Qualquer agente antineoplásico adequado pode ser usado, tal como um agente quimioterapêutico, radiações ou combinações destes. O agente antineoplásico pode ser um agente alquilante ou um anti-metabolito. Exemplos de agentes alquilantes incluem, mas não estão limitados a, cisplatina, ciclofosfamida, melfalan, e dacarbazina. Exemplos de anti-metabolitos incluem, mas não se limitam a, doxorubicina, daunorubicina, e paclitaxel, gemcitabina.

Agentes antineoplásicos úteis também incluem inibidores de mitose, como taxanos, docetaxel e paclitaxil. Inibidores da topoisomerase são outra classe de agentes antineoplásicos que podem ser usados em combinação com anticorpos da invenção. Estes incluem inibidores da topoisomerase I ou topoisomerase II. Inibidores da topoisomerase I incluem irinotecano (CPT-11), aminocamptotecina, camptotecina, DX-8951f, topotecano. Inibidores da topoisomerase II incluem etoposido (VP-16), e teniposido (VM-26). Outras substâncias estão actualmente a ser avaliadas em relação à actividade inibitória de topoisomerase e eficácia como agentes antineoplásicos. numa modalidade preferida, o inibidor da topoisomerase é irinotecano (CPT-11).

Num aspecto particular um anticorpo anti-IGF-IR é administrado em combinação com docetaxel. Um anticorpo



anti-PDGFR $\alpha$  é administrado em combinação com doxorubicina.

Quando o agente antineoplásico é a radiação, a fonte de radiação pode ser tanto externa (terapia por feixe de radiação externo - EBRT) ou interna (braquiterapia - BT) relativamente ao paciente a ser tratado. A dose de agente antineoplásico administrada depende de vários factores, incluindo, por exemplo, o tipo de agente, o tipo e gravidade do tumor a ser tratado e da via de administração do agente. Deve-se enfatizar, no entanto, que a presente invenção não se limita a qualquer dose particular.

Os tratamentos com anticorpos (anti-IGF-IR ou anti-PDGFR $\alpha$ ) e com anticorpos mais agente antineoplásico também podem ser utilizados para os pacientes que recebem terapia adjuvante hormonal (por exemplo, para o cancro da mama) ou terapia de privação de androgénio (por exemplo, cancro de próstata).

Antagonistas anti-IGF-IR e anti-PDGFR $\alpha$ s podem ser co-administrados, ou administrados com antagonistas do receptor que neutralizam outros receptores envolvidos no crescimento tumoral ou na angiogénese. Por exemplo um anticorpo anti-IGF-IRs e um anticorpo anti-PDGFR $\alpha$  são co-administrados. Num aspecto em que uma célula tumoral alvo expressa tanto IGF-IR como PDGFR $\alpha$ , elementos da transdução de sinal comuns são activados por transdução de sinal através de cada receptor. Embora a inibição de um receptor

geralmente resulte na diminuição da activação dos componentes comuns a jusante, a inibição da activação de ambos os receptor vai diminuir ainda mais a activação. Noutro aspecto, certas células num tumor ou de um tecido circundante expressam quantidades significativas de um receptor, e outras células expressam quantidades significativas do segunda receptor. A co-administração dos antagonistas reduz o crescimento das células tumorais e a estimulação parácrina das células circundantes.

Um anticorpo bi-específico pode ser fornecido como uma alternativa à co-administração. A variedade de anticorpos bi-específicos que existem são concebidos para incorporar diversas características desejáveis. Por exemplo, diacorpos bi-específicos têm tamanho mínimo. Anticorpos bi-específicos com quatro locais de ligação a antigénios (dois para cada especificidade de ligação) têm avides de ligação de que são semelhantes aos dos anticorpos naturais correspondentes. Certos anticorpos bi-específicos incorporam regiões Fc, assim mantendo funções efectoras (por exemplo, citotoxicidade dependente do complemento (CDC) e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC)), dos anticorpos naturais. WO 01/90192 descreve anticorpos tetravalentes similares a IgG WO2006/020258 descreve um anticorpo tetravalente que integra dois diacorpos e mantém funções efectoras.

Noutro aspecto, um anticorpo anti-IGF-IR ou um anticorpo anti-PDGFR $\alpha$  ou outro antagonista é usado em

combinação com um antagonista de receptor que se liga especificamente a um receptor do factor de crescimento epidérmico (por exemplo, EGFR, Her2/erbB2, erbB3, erbB4). Especialmente preferidas são as proteínas de ligação ao antigénio que se ligam ao domínio extracelular do EGFR e bloqueiam a ligação de um ou mais dos seus ligandos e/ou neutralizam activação induzida por ligando do EGFR. Antagonistas de EGFR também incluem anticorpos que se ligam a um ligando de EGFR e inibem a ligação do EGFR ao seu ligando. Ligandos EGFR incluem, por exemplo, EGF, TGF- $\alpha$ , amfirregulina, EGF de ligação à heparina (HB-EGF) e betacelulina. Pensa-se que EGF e TGF- $\alpha$  sejam os principais ligandos endógenos que resultam na estimulação mediada por EGFR, embora TGF- $\alpha$  tenha mostrado ser mais potente na promoção da angiogénese. Os antagonistas de EGFR também incluem substâncias que inibem a dimerização de EGFR com outras subunidades de receptor de EGFR (ou seja, EGFR homodímeros) ou hetero-dimerização com outros receptores de factores de crescimento (por exemplo, HER2). Antagonistas de EGFR incluem ainda moléculas biológicas e moléculas pequenas, como os inibidores da cinase sintéticos que atuam directamente no domínio citoplasmático de EGFR para inibir a transdução de sinal mediada por EGFR. Erbitux® (o cetuximab) é um exemplo de um antagonista de EGFR que se liga ao EGFR e bloqueia a ligação do ligando. Um exemplo de uma molécula pequena antagonista de EGFR é IRESSA™ (ZD1939), que é um derivado de quinozalina que funciona como um mimético do ATP para inibir EGFR. Ver Patente US no. 5,616,582 (Zeneca Limited); WO 96/33980 (Zeneca

Limited) na p. 4; ver também, Rowinsky et al, Abstract 5 apresentado no 37th Annual Meeting of ASCO, São Francisco, CA, 12-15 de Maio de 2001; Anido et al, Abstract 1712 apresentado no 37th Annual Meeting of ASCO, São Francisco, CA, 12-15 de Maio de 2001. Outro exemplo um antagonista de EGFR de molécula pequena é Tarceva® (QSI-774), que é um inibidor de EGFR derivado de 4-(fenilamina substituída)-quinozalina [cloridrato de 6,7-di(2-metoxi-etoxi)-quinoxolin-4-il]-(3-etinil-fenil)amina]. Ver WO 96/30347 (Pfizer Inc.) em, por exemplo, na página 2, linha 12, até a página 4, linha 34, página 19, linhas 14-17. Ver também Moyer et al., *Cancer Res.*, 57: 4838-48 (1997); Pollack et al., *J. Pharmacol*, 291: 739-48 (1999). Tarceva® pode funcionar através da inibição da fosforilação de EGFR e das suas vias de transdução de sinal de cinase a jusante PI3/Akt e MAP (proteína activada pelo mitogénio) resultando na paragem do ciclo celular mediada por p27. Ver Hidalgo et al., Abstract 281 apresentado no 37th Annual Meeting of ASCO, São Francisco, CA, 12-15 de Maio de 2001.

Outras moléculas pequenas também foram relatadas que inibem, muitas das quais pensa-se serem específicas para o domínio tirosina cinase de um EGFR. Alguns exemplos desses antagonistas de EGFRs de molécula pequena são descritos em WO 91/116051, WO 96/30347, WO 96/33980, WO 97/27199 (Zeneca Limited). WO 97/30034 (Zeneca Limited), WO 97/42187 (Zeneca Limited), WO 97/49688 (Pfizer Inc.), WO 98/33798 (Warner Lambert Company), WO 00/18761 (American Cyanamid Company), e WO 00/31048 (Warner Lambert

Company). Exemplos específicos de antagonista de EGFRs de molécula pequena incluem C1-1033 (Pfizer), que é uma quinozalina (N-[4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-7-(3-morfolin-4-il-propoxi)-quinazolin-6-il]-acrilamida) inibidora da tirosina cinase, particularmente EGFR e é descrita em WO 00/31048 na página 8, linhas 22-6; PKI166 (Novartis), que é um inibidor pirrolopirimidina de EGFR e é descrito em WO 97/27199 nas páginas 10-12; GW2016 (Glaxo Smith Kline), que é um inibidor de EGFR e HER2; EKB569 (Wyeth), que é relatado inibir o crescimento de células tumorais que sobre-expressam EGFR ou HER2 *in vitro* e *in vivo*; AG-1478 (Trifostina), que é uma quinazolina de molécula pequena que inibe a sinalização de ambos os EGFR e erbB-2; AG-1478 (Sugen), que é um inibidor de dois substratos que também inibe a proteína cinase CK2; PD 153035 (Parke-Davis), que é relatada inibir a actividade EGFR cinase e o crescimento tumoral, induz a apoptose nas células em cultura, e aumenta a citotoxicidade de agentes quimioterapêuticos citotóxicos; SPM-924 (Schwarz Pharma), que é um inibidor da tirosina cinase direccionado para o tratamento do cancro da próstata; CP-546.989 (OSI Pharmaceuticals), que é declaradamente um inibidor da angiogénese para o tratamento de tumores sólidos; ADL-681, que é um inibidor da cinase EGFR direccionado para o tratamento do cancro; PD 158780, que é uma piridopirimidina que é relatada inibir a taxa de crescimento do tumor de xenoenxertos A4431 em ratinhos; CP-358774, que é uma quinazolina que é relatada inibir a autofosforilação em xenoenxertos HN5 em ratinhos; ZD 1839, que é uma quinazolina que é relatada a ter actividade anti-

tumoral em modelos de xenoenxertos em ratinhos incluindo os cancros vulvar, NSCLC, da próstata, do ovário, e colorectais; CGP 59326A, que é uma pirrolopirimidina que é relatada inibir o crescimento de xenoenxertos EGFR-positivos em ratinhos; PD 165557 (Pfizer); CGP54211 e CGP53353 (Novartis), que são dianilnoftalimidias. Inibidores de EGFR de tirosina cinase derivados naturalmente incluem genisteína, herbimicina A, quercetina, e erbstatina.

Moléculas pequenas adicionais relatadas inibirem EGFR e são compostos tricíclicos tais como os compostos descritos na Patente US No. 5,679,683; derivados de quinazolina, tais como os derivados descritos na Patente US No. 5,616,582; e compostos de indole tais como os compostos descritos na Patente US No. 5,196,446.

Outro receptor que pode ser direccionado em conjunto com IGF-IR ou PDGFR $\alpha$  é um receptor vascular do factor de crescimento do endotélio (VEGFR). Um anticorpo anti-IGF-IR ou anti-PDGFR $\alpha$  é usado em combinação com um antagonista de VEGFR. Numa realização, um antagonista é usado que se liga especificamente ao receptor VEGFR-1/Flt-1. Noutro aspecto, o antagonista de VEGFR liga-se especificamente ao receptor VEGFR-2/KDR. São particularmente preferidas proteínas que se ligam ao antigénio que se ligam ao domínio extracelular de VEGFR-1 ou VEGFR-2 e bloqueiam a ligação pelos seus ligandos (VEGFR-2 é mais fortemente estimulada por VEGF, VEGFR-1 é mais fortemente estimulada por PlGF, mas também por VEGF) e/ou neutralizam a activação

induzida pelo ligando. Por exemplo, IMC-1121 é um anticorpo humano que se liga a e neutraliza VEGFR-2 (WO 03/075840; Zhu). Outro exemplo é MAb 6.12 que se liga a VEGFR-1 solúvel e expresso na superfície das células. ScFv 6,12 compreende os domínios  $V_L$  e  $V_H$  do anticorpo monoclonal de ratinho MAb 6.12. Uma linhagem de células de hibridomas produtores de MAb 6.12 foi depositada sob o número ATCC PTA-3344 ao abrigo das disposições do Tratado de Budapeste sobre o Reconhecimento Internacional do Depósito de Microrganismos para efeitos de Procedimento de Patentes e os regulamentos correspondentes (Tratado de Budapeste). Noutro aspecto, o antagonista de VEGFR liga-se a um ligando de VEGFR e bloqueia a activação de um VEGFR pelo ligando. Por exemplo, o Avastin® (bevacizumab) é um anticorpo que se liga ao VEGF.

Outros exemplos de receptores de factor de crescimento envolvidos na tumorigénese são o factor de crescimento nervoso (NGFR), e factor de crescimento de fibroblasto (FG-FR).

Em mais um aspecto alternativo, os anticorpos anti-IGF-IR e anti-PDGFR $\alpha$  tanto podem ser administrados em combinação com um ou mais adjuvantes adequados, tais como, por exemplo, citocinas (IL-10 e IL-13, por exemplo) como com outros estimuladores imunes, tais como, mas não limitado a, quimiocinas, antigénios associados a tumores, e péptidos. Ver, por exemplo, Larrivéé et al., supracitado. Deverá ser apreciado, no entanto, que a administração de

apenas um anticorpo anti-IGF-IR ou anti-PDGFR $\alpha$  é suficiente para impedir, inibir, ou reduzir a progressão tumoral de modo terapêuticamente eficaz.

Numa terapia de combinação, o anticorpo anti-IGF-IR ou anti-PDGFR $\alpha$  é administrado antes, durante ou depois da terapia com um outro agente, bem como qualquer sua combinação, ou seja, antes e durante, antes e depois, durante e depois, ou antes, durante e depois do início da terapia com o agente antineoplásico. Por exemplo, o anticorpo pode ser administrado entre 1 e 30 dias, de preferência 3 e 20 dias, mais preferentemente entre 5 e 12 dias antes de iniciar a terapia por radiação. Num aspecto preferido, a quimioterapia é administrado concomitantemente com ou, mais preferentemente, depois da terapia com anticorpo.

Qualquer método ou via adequados podem ser utilizados para administrar anticorpos da invenção e, opcionalmente, para co-administrar agentes antineoplásicos e/ou antagonistas de outros receptores. Os regimes de agente antineoplásico utilizados, de acordo com a invenção, incluem qualquer regime que se pensa ser melhor adequado para o tratamento da condição neoplásica do paciente. Diferentes doenças malignas podem exigir uso de anticorpos anti-tumorais específicos e de agentes antineoplásicos específicos, que será determinado de paciente para paciente. As vias de administração incluem, por exemplo, via oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, ou



intramuscular. A dose de antagonista administrada depende de vários factores, incluindo, por exemplo, o tipo de antagonistas, o tipo e a gravidade do tumor a ser tratado e da via de administração dos antagonistas. Deve-se enfatizar, no entanto, que a presente divulgação não se limita a um método particular ou à via de administração.

Alguém perito na técnica entenderá que as doses e a frequência do tratamento dependerão da tolerância do paciente individual e das propriedades farmacológicas e farmacocinéticas do agente de bloqueio ou inibidor utilizado. Idealmente, pretende-se alcançar uma farmacocinética saturável para o agente utilizado. A dose para ambos os anticorpos anti-IGF-IR e anti-PDGFR $\alpha$  pode variar, por exemplo, de cerca de 10 a cerca de 1000 mg/m<sup>2</sup>, de preferência a partir de cerca de 200 a cerca de 400 mg/m<sup>2</sup>. Isto pode ser seguido por várias outras dosagens diárias ou semanais variando, por exemplo, de cerca de 200 a cerca de 400 mg/m<sup>2</sup>. O paciente é monitorizado por efeitos secundários e o tratamento é interrompido quando tais efeitos colaterais são graves.

Alguém perito na técnica também saberá como acompanhar a evolução do tratamento, de modo a determinar uma dose eficaz. Para as metástases ósseas de cancro de próstata, uma tal maneira é acompanhar os níveis de PSA. Outras maneiras de acompanhar as metástases ósseas incluem varrimentos ósseos e IRM.

Para os pacientes para os quais a perda óssea induzida pelo tratamento do cancro (CTIBL) é um risco ou problemático (por exemplo, os pacientes que recebem terapia hormonal adjuvante para o cancro da mama ou terapia de privação de androgénio para cancro da próstata), qualquer tratamento supracitado pode ser suplementado pela administração dos agentes de prevenção de CTIBL, tais como bifosfonatos. Bisfosfonatos incluem, por exemplo, clodronato, risedronato, e ácido zoledrónico.

As descrições detalhadas dos métodos convencionais, tais como aqueles utilizados na construção de vectores e plasmídeos, e expressão de anticorpos e fragmentos de anticorpos podem ser obtidos a partir de diversas publicações, incluindo Sambrook, J et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a edição., Cold Spring Harbor Laboratory Press; Coligan, J. et al. (1994) Current Protocols in Immunology, Wiley & Sons, Incorporated; Enna, SJ. et al. (1991) Current Protocols in Pharmacology, Wiley & Sons, Bonifacino, JS et al. (1999) Current Protocols in Cell Biology, Wiley & Sons.

## **EXEMPLOS**

### **Exemplo 1 (APENAS PARA REFERÊNCIA)**

**Efeitos do IMC-A12 e do docetaxel sobre o crescimento tumoral.** Pedacos de tumores (20 a 30 mm<sup>3</sup>) de LuCaP 35V independente do androgénio (AI) foram implantados

por via subcutânea (s.c.) em 32 ratinhos SCID castrados com seis semanas de idade respectivamente como descrito anteriormente (4). Quando a implantação tumoral foi observada atingir um volume de 150-200 mm<sup>3</sup>, os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos para estudos de tratamento. Os animais do grupo 1 receberam tratamento com docetaxel numa dose de 20 mg/kg. Os animais do Grupo 2 receberam tratamento com docetaxel numa dose de 10 mg/kg. Os animais do Grupo 3 receberam tratamento combinado de 10 mg/kg de docetaxel e 40 mg/kg de A12. Os animais do Grupo 4 receberam tratamento combinado de 20 mg/kg de docetaxel e 40 mg/kg de A12. Todos os tratamentos foram administrados por via intraperitoneal (ip). O docetaxel foi administrado uma vez por semana. O A12 foi administrado três vezes por semana. Todos os animais foram tratados durante quatro semanas e monitorizados durante quatro semanas adicionais antes do sacrifício. Os tumores foram medidos duas vezes por semana e volume tumoral foi calculado pela fórmula:  $\text{Volume} = L \times W^2/2$ . Seguindo o nosso protocolo de animais aprovado pelo IACUC da Universidade de Washington, alguns animais foram sacrificados uma mais cedo, quando o tumor atingiu um volume de 1000 mm<sup>3</sup> ou quando a perda de peso corporal dos animais ultrapassou 20% de peso corporal inicial. Os animais foram pesados duas vezes por semana. Amostras de sangue foram recolhidas do seio orbital semanalmente. O soro foi separado e o nível de PSA foi determinado utilizando o IMx Total PSA Assay (Abott Laboratories, Abott Park, IL). Injectou-se BrdU foi nos tumores 1 hora antes dos animais serem sacrificados para

avaliação da taxa de proliferação de células tumorais *in vivo*.

Após o sacrifício, os tumores foram recolhidos e divididos em dois. Uma porção dos tumores foi fixada em tampão neutro de formalina 10% (NFB), e incorporados em parafina. Seções de cinco microns foram preparadas para coloração imuno-histoquímica (IHC). A parte restante do tumor foi dividida mecanicamente em células únicas por trituração e filtradas através de peneiros de Nylon de 70  $\mu\text{m}$ .

Conforme mostrado na Fig. 1, xenoenxertos LuCaP 35V cresceram agressivamente em ratinhos com uma taxa média de crescimento de  $362,0 \pm 72,0 \text{ mm}^3/\text{semana}$  sem qualquer tratamento. Todos os animais do grupo não-tratados tiveram de ser sacrificados no prazo de três semanas após o início do tratamento em grupos experimentais, devido ao volume tumoral exceder  $1000 \text{ mm}^3$ . Quando os animais foram tratados com  $40 \mu\text{g}/\text{kg}$  de A12 isoladamente, a taxa de crescimento tumoral foi reduzida a  $192,7 \pm 35,6 \text{ mm}^3/\text{semana}$  durante o tratamento. Quando o docetaxel foi administrado aos animais numa dose de  $10 \text{ mg}/\text{kg}$ , a taxa de crescimento de tumor LuCaP 35V foi reduzida para uma média de  $29,6 \pm 6,1 \text{ mm}^3/\text{semana}$ . Quando o docetaxel foi administrado em combinação com tratamento A12, a taxa de crescimento de tumor LuCaP 35V foi ainda reduzida a uma média de  $7,9 \pm 1,0 \text{ mm}^3/\text{semana}$  (Fig. 1b). O efeito inibitório do docetaxel combinado com A12 persistiu por mais de quatro semanas após o fim do

tratamento. Quando uma maior dose de docetaxel (20 mg/kg) foi dada aos animais, independentemente, com ou sem tratamento combinado com A12, o volume tumoral não aumentou durante o período de tratamento de quatro semanas; pelo contrário, uma tendência de redução do volume tumoral foi observada. Porém, nas quatro semanas seguintes após o tratamento, a redução do volume tumoral foi mantida no grupo de animais tratados com docetaxel combinado com A12. Pelo contrário, os volumes tumorais foram aumentando a uma taxa média de  $27,0 \pm 16,1$  mm<sup>3</sup>/semana no grupo de animais tratados apenas com docetaxel. Estes resultados sugeriram que, numa determinada dose de docetaxel, o tratamento combinado com A12 pode aumentar o efeito inibitório do docetaxel sobre o crescimento tumoral durante o tratamento ou após acompanhamento do tratamento.

PSA é um parâmetro clínico comumente utilizado para avaliar o crescimento tumoral na próstata. Os níveis de PSA no soro foram medidos em animais durante e após o tratamento. Conforme mostrado na Fig. 1c, nos animais tratados com A12 e docetaxel ou 20 mg/kg apenas com docetaxel, nenhuma mudança significativa foi observada nos níveis séricos de PSA durante as quatro semanas de tratamento, compatível com o crescimento tumoral reprimido. Após o fim do tratamento, os níveis séricos de PSA apresentaram aumentos em animais tratados apenas com docetaxel e, pelo contrário, consistentes ou mesmo diminuídos em animais tratados com docetaxel em associação com A12. Estes dados são consistentes com a continuação da inibição

pós-tratamento do crescimento tumoral em animais tratados com docetaxel e A12.

**Indução da apoptose por docetaxel combinado com anticorpo anti-IGF-IRs.** O efeito combinado *in vivo* do tratamento com docetaxel e A12 no ciclo celular e sobrevivência das células no ponto final das experiências foi medido por ensaio de marcação da extremidade "nick" mediada por desoxinucleotidil transferase terminal (TUNEL) e marcação com propídio (PI) utilizando o Apop-Direct Kit (BioScience BD), como descrito anteriormente. Resumidamente,  $1 \times 10^6$  células de uma suspensão de células individuais foram fixadas com tampão formalina neutro 10% (NBF), seguido por 70% de etanol a 20°C durante 30 minutos. Após várias lavagens, as células foram permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 e incubadas com dUTP conjugado com FITC e enzima desoxinucleotidil transferase terminal (TdT) a 37°C durante 1 hora, seguido de uma incubação com tampão PI/RNase (100 µg/mL de PI, 50 µg/mL de RNase) à temperatura ambiente durante 60 minutos. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo usando um FACscan da BD. Os dados foram analisados com o programa informático CellQuest<sup>PRO</sup>.

Quatro semanas após o fim do tratamento, a apoptose foi detectada numa percentagem significativa dos tumores de animais que foram tratados com docetaxel (66,7% no grupo tratado com 10 mg/kg de docetaxel e 77,8% no grupo tratado com 20 mg/kg de docetaxel), em combinação com A12 (Fig. 2b e Tabela 1), independentemente da dose de

docetaxel usada. A média de eventos apoptóticos nestes tumores ocorreu a uma taxa de  $15,0 \pm 4,3\%$ . Nenhuma apoptose em tumores foi detectada em animais que foram tratados apenas com docetaxel. Em vez disso, a maioria (88% em grupo tratado com 10 mg/kg de docetaxel e 100% no grupo tratado com 10 mg/kg de docetaxel) dos tumores procedeu ao ciclo celular normal (Fig. 2a e Tabela 3).

Tabela 3 - Ciclo celular tumoral e actividades de sobrevivência no momento do sacrifício				
Tratamento	Apoptose (%)	Paragem G1 (%)	Paragem G2 (%)	Ciclo normal (%)
Nenhum	0	0	0	100
Doc (20)	0	0	0	100
Doc (20) + A12	66,7	33,3	0	0
Doc (10)	0	0	12	88
Doc (10) + A12	77,8	0	0	12,2

Para avaliar ainda mais a capacidade de proliferação de células tumorais após o final de diferentes tratamentos, secções em parafina marcadas com anticorpo anti-BrDu. Amostras tumorais foram fixadas em 10% NBF, embebidas em parafina, e seccionadas a 5  $\mu\text{m}$  em lâminas. Após remoção da parafina e reidratação, os antigénios foram recuperados com 0,01 M de ácido cítrico (pH 6,0) a 95°C durante 2x5 minutos. Deixou-se as lâminas arrefecer durante 30 minutos, seguindo-se por lavagem sequencial com PBS. A actividade de peroxidase endógena foi interrompida por uma incubação com 0,3% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em metanol durante 15 minutos. Após o bloqueio com soro de cabra normal a 1,5% em PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) durante 1 h, as lâminas

foram incubadas com o anticorpo anti-BrdU de ratinho (1 µg/mL) durante 1 hora seguida da incubação sequencial com IgG de cabra biotinilado anti-ratinho durante 30 minutos, avidina marcada com peroxidase durante 30 minutos (Santa Cruz Biotechnology) e diaminobenzidina (DAB)/substrato peróxido de hidrogénio cromogénio (Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 5-10 minutos. Todas as etapas de incubação foram realizadas à temperatura ambiente. As lâminas foram contra-marcadas com hematoxilina (Sigma), e montadas com permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey). Para controlo negativo, usou-se IgG de ratinho (Vector Laboratories) em vez de anticorpo anti-BrdU primário. As lâminas foram examinadas sob um Microscópio Zeiss e imagens digitais foram obtidas. Números de núcleos marcados com BrdU e núcleos totais foram recolhidos de 10 vistas aleatórias de cada seção. O índice de proliferação foi calculado pelo número de núcleos BrdU-positivos dividido pelo número total de núcleos. Dez campos foram contados por lâmina. A marcação H&E foi realizada usando hematoxilina e eosina (Richard Allen, Kalamazoo, MI).

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



**Regulação diferencial da expressão génica em tumores tratados com docetaxel combinado com anticorpo anti-IGF-IRs vs. apenas docetaxel.** Para determinar os mecanismos potenciais para o efeito do docetaxel nitidamente reforçado por A12, a expressão de IGF-IR foi analisada em todos os tumores recolhidos por análise imuno-histoquímica e citometria de fluxo. Não houve diferença na expressão de IGF-IR de superfície entre todos os grupos de tratamento ou em comparação com o grupo de controlo (dados não apresentados). A expressão génica pós-tratamento foi analisada utilizando análises de "microarray" de cADN em tumores de animais que receberam 20 mg/kg de docetaxel e 20 mg/kg de docetaxel combinado com A12. Baseado em análise SAM, 49 genes foram identificados como diferentemente expressos em tumores que receberam o tratamento combinado de docetaxel e A12, em comparação com aqueles que receberam apenas docetaxel, com uma alteração superior a 2 vezes e menos de 10% de taxa de falsos positivos (FDR) (dados não apresentados). Treze genes foram identificados que estão potencialmente envolvidos na regulação do ciclo celular ou da apoptose (Tabela 4). Todos os 13 genes apresentaram uma diferença de pelo menos 2 vezes entre os dois tratamentos e tinham um FDR inferior a 0,02%. Nove genes estavam sub-expressos e quatro sobre-expressos em tumores tratados com docetaxel e A12, em comparação com tumores tratados com docetaxel isoladamente.

Tabela 4 - Expressão genética diferenciada pós-tratamento em tumores tratados com docetaxel + A12, em comparação com tumores tratados com docetaxel isoladamente.				
HUGO	Nome	Função GO	Vezes de alteração	FDR
Genes com regulação negativa				
CDC2	Ciclo de divisão celular 2	citocinese; mitose;	3,0	≤0,02%
CDC6	Homólogo de ciclo de divisão celular 6 CDC6	regulação negativa da proliferação celular	2,2	≤0,02%
CCNA2	Ciclina A2	regulação da actividade de CDK	2,1	≤0,02%
MYBL2	Homólogo de oncogene viral de Mieloblastose V-myb do tipo (aviário) 2	anti-apoptose; desenvolvimento; regulação do ciclo celular;	3,2	≤0,02%
TUBB	Polipéptido tubulina beta	movimento baseado em microtúbulos resistência a taxano	2,3	≤0,02%
K-ALFA-1	Tubulina alfa ubíqua	movimento baseado em microtúbulos resistência a taxano	2,5	≤0,02%
BIRC5	Baculoviral contendo repetição IAP 5 (survivina)	anti-apoptose	2,5	≤0,02%
CDC25B	Ciclo da divisão celular 25B	regulação positiva da proliferação celular	2,0	≤0,02%
MYC	Homólogo de oncogene viral de mielocitomatose V-myb (aviária)	Paragem do ciclo celular	2,5	≤0,02%
Genes com regulação negativa				
TOB1	Transdutor de ERBB21	regulação negativa da proliferação celular	2,2	≤0,02%
CCNG2	Ciclina G2	ponto de controlo do ciclo celular	2,1	≤0,02%
IGFBP3	Proteína de ligação ao factor de crescimento similar à insulina 3	regulação de crescimento celular, pró-apoptótico	2,0	≤0,02%
BIRC3	Baculoviral contendo repetição IAP 3	Anti-apoptose; transdução de sinal ligado ao receptor de superfície celular	2,2	≤0,02%

Para genes seleccionados, os resultados foram confirmados por RT-PCR em tempo real. Um fragmento padrão de PCR de cADN alvo foi purificado. Uma série de diluições dos padrões de 10 ng/ $\mu$ L a  $10^{-3}$  pg/ $\mu$ L de foi utilizada para RT-PCR em tempo real para gerar curvas padrão. Um  $\mu$ g de ARN total de cada grupo de tumor reunido foi utilizado para a síntese da primeira cadeia de cADN usando Superscript First Strand Synthesis System (Invitrogen). Realizou-se RT-PCR em tempo real em 20  $\mu$ L de mistura reaccional contendo 1  $\mu$ L da primeira cadeia de cADN, conjuntos específicos de iniciadores, e Lightcycler FastStart DNA Master Plus SYBR Green usando um Roche Lightcycler seguindo o protocolo do fabricante (Roche, Nutley, NJ). Os produtos de RT-PCR foram submetidos a análise de curvas de fusão utilizando o programa Lightcycler v3.5. Os tamanhos dos amplicões foram confirmados por electroforese em gel de agarose. Cada amostra foi testada em duplicado. Os resultados são apresentados na Fig. 4.

Dos genes com regulação negativa, mostrou-se que TUBB resultava em resistência ao docetaxel (Tanaka et al. 2004, *Int. J. Cancer* 111, 617-26), e verificou-se que o aumento da expressão de BIRC 5 (survivina) estava associado ao cancro de próstata agressivo e à resistência à terapia antiandrogénica (de Angelis et al. 2004, *Int. J. Oncol.* 24, 1279-88; Zhang et. al. 2005, *Oncogene* 24, 2474-82). Além disso, TUBB é um gene regulado por IGF-IR que está envolvido com a transformação mediada por IGF-IR (Loughran et al. 2005, *Oncogene* 24, 6185-93). Dos quatro genes com

regulação positiva, verificou-se que IGFBP3 inibia a sinalização de ligando de IGF, bem como induzia a apoptose nas células tumorais de próstata de forma dependente de ligando (Grimberg et al., 2000, J. Cell. Physiol. 183, 1-9).

**Níveis séricos de A12 pós-tratamento.** Os níveis séricos de A12 foram medidos em animais que receberam docetaxel havia combinado com a A12. Os níveis séricos de A12 diminuíram 100 vezes duas semanas após a interrupção do tratamento e foram detectados a um nível muito baixo quatro semanas após a interrupção do tratamento (Fig. 5).

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

**Terapia com anticorpo anti-IGF-IR para metástases ósseas.** A eficácia do tratamento com anticorpos anti-IGF-IR sobre o crescimento metastásico do cancro da próstata em

células ósseas foi avaliada usando células de cancro da próstata injectadas directamente na tíbia de ratinhos SCID. Por este método, tumores metastásicos são estabelecidos directamente, sem dependência de invasão dependente de quimiotaxia pela circulação. Uma variedade de linhagens tumorais está disponível para estabelecer as metástases ósseas. Estes incluem células PC-3, LuCaP35, e LnCaP que produzem lesões osteolíticas e células LuCaP 23.1 que produzem lesões osteoblásticas.

Células LuCaP 23.1, que expressam IGF-IR, têm um índice de incorporação de ~80% no ambiente ósseo e resultam em reacções osteoblásticas. Em experiências preliminares, amostras de LuCaP 23.1 apresentaram um aumento significativo no volume de osso vs volume de tecido (%BV/TV) em tíbias tumorais vs. controlo (254-503% do controlo;  $p = 0,024$ ). Todos os tumores LuCaP 23.1 nas tíbias apresentaram novos tubérculos ósseos, que não estavam presentes nas amostras normais, e um elevado número de focos tumorais, que tinha substituído a medula óssea normal. Nalguns espécimes o crescimento tumoral e ósseo estendeu-se para fora do osso original. A %BV/TV aumentada de amostras LuCaP 23.1 também foi observada após a castração; a %BV/TV de tíbias com tumor foi 212-354% daquela de tíbias sem o tumor ( $p = 0,024$ ). Os resultados observados para os xenoenxertos intra-tíbia de LuCaP 23.1 são indicativos da formação de osso *de novo* estimulada por células tumorais. Além disso, os tumores apresentam muitas semelhanças com amostras humanas de metástases ósseas

osteoblásticas, incluindo um grande número de focos tumorais e aumento da quantidade de osso mineralizado.

Para avaliar a eficácia do tratamento com IMC-A12, xenoenxertos de tumores LuCaP 23.1 foram enxertados em ratinhos SCID, e os níveis séricos de PSA foram medidos duas vezes por semana para avaliar o crescimento tumoral. Todos os animais foram castrados duas semanas antes do enxerto das células tumorais na tíbia. A administração de IMC-A12 para testar ratinhos foi iniciada quando os níveis séricos de PSA atingiram 5-10 ng/mL (indicando tumores estabelecidos). Injectou-se 40 mg/kg IMC-A12 ip três vezes por semana durante seis semanas.

A densidade mineral óssea (DMO) da tíbias com tumores e das tíbias contra-laterais sem tumor foi medida por absorciometria dupla de raios-X (PIXImus Lunar densitometer) realizada numa área de 2,5 mm x 2,5 mm no local de injeção de células tumorais, ou o local correspondente da tíbia contra-lateral no momento do enxerto. A avaliação a cada duas semanas das lesões foi realizada pelas medições de PSA no soro. Todos os animais foram sacrificados quando as lesões ósseas no grupo de controlo tinha recorrido após castração baseada em níveis séricos de PSA (LuCaP 35 >60 ng/mL, LuCaP 23.1 >500 ng/mL), aparência radiográfica das lesões ósseas ou quando os animais se tornaram comprometidos. Uma hora antes de serem sacrificados, os animais foram injectados com BrdU para monitorizar a proliferação de células tumorais. As

radiografias foram tomadas antes do sacrifício (FaxitronX-ray MX-20), e mediu-se a DMO de ambas as tíbias no momento do sacrifício.

Tabela 5 - Densidade mineral óssea (DMO)				
Tratamento	A12		Controlo	
	Perna com tumor	Perna sem tumor	Perna com tumor	Perna sem tumor
Média	0,060	0,045	0,098	0,053
Valor P em comparação com o tumor controlo	0,0057			
Valor P em comparação com a perna sem tumor	0,0004		0,0049	

Os níveis de PSA no soro foram significativamente mais baixos em ratinhos tratados com IMC-A12 (Fig. 7), e o aumento da DMO associados com o crescimento de tumores metastásicos osteoblásticos foi significativamente reduzido (Tabela 5). As medições de DMO das pernas sem tumor indicou que tratamento com IMC-A12 não provocou uma perda de densidade óssea (osteoporose). Radiografias dos ratinhos tratados e não tratados com IMC-A12 mostram que a progressão tumoral foi significativamente reduzida ou impedida em ratinhos tratados (Fig. 8).

**Combinação de anticorpo anti-IGF-IR e docetaxel para metástases ósseas.** Ratinhos SCID são castrados 2 semanas antes das injeções de tumores na tíbia. As metástases ósseas são geradas por injeção directa de células de cancro de próstata LuCaP 23.1 na tíbia dos ratinhos, dando origem a lesões osteoblásticas. Os enxertos expressam IGF-IR. Os níveis séricos de PSA são medidos a

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

Em dois grupos, 40 mg/kg de BVIC-A12 são injectados i.p. três vezes por semana durante seis semanas com um grupo recebendo IMC-A12 + Docetaxel 20 mg/kg i.p., uma vez por semana durante 6 semanas e um segundo grupo IMC-A12 + Docetaxel 10 mg i.p. três vezes por semana durante 6 semanas. Os grupos de controlo grupos recebem 10 ou 20 mg de docetaxel i.p. sem IMC-A12.

Os animais são monitorizados semanalmente com medições de PSA. Após o fim do tratamento, os animais continuam a ser monitorizados semanalmente com medições de PSA até que os tumores em grupos com apenas docetaxel mostrem ressurgimento tumoral. Com o aumento de valores de PSA de grupos de apenas docetaxel (embora a um ritmo mais lento que em animais não tratados), os níveis de PSA em ratinhos tratados com IMC-A12 + docataxel estabilizam, e nalguns animais, começam a decrescer. Verifica-se que as reduções nos níveis de PSA continuam, mesmo após o final do tratamento às seis semanas.

Como indicado acima, as medições de DMO são realizadas no momento do enxerto e no sacrifício, e radiografias são tomadas apenas antes do sacrifício. Os grupos tratados com IMC-A12 + docataxel mostram pouco ou



nenhum aumento na DMO, e as radiografias mostram pouca ou nenhum sinal de actividade osteoblástica.

**Combinação de anticorpo anti-IGF-IRs e docetaxel para metástases ósseas.** Pedacos de tumor de próstata LuCaP 23.1 humano (20 a 30 mm<sup>3</sup>) foram mecanicamente digeridos. 2-5 x 10<sup>5</sup> de células viáveis LuCaP 23.1 foram injectadas nas tíbias de ratinhos SCID com 6-8 semanas de idade. 21 ratinhos distribuídos aleatoriamente em três grupos foram usados para o estudo. Após a injeção tumoral, a PSA no soro foi monitorizada semanalmente. O tratamento começou quando o nível sérico de PSA alcançou 5-10 ng/mL, uma indicação de crescimento tumoral. O grupo 1 recebeu veículo de tampão salino de controlo. O grupo 2 recebeu 20 mg/kg de docetaxel i.p., uma vez por semana durante 4 semanas. O grupo 3 recebeu 20 mg/kg de docetaxel, uma vez por semana e 40mg/kg de A12 i.p. três vezes por semana durante 4 semanas. Para determinar se a resposta ao tratamento foi osteoblástica ou osteolítica, mediu-se DMO por DEXA e raios X dos animais no ponto final de todos os tratamentos.

Apenas docetaxel ou docetaxel combinado com A12 inibiram significativamente o crescimento tumoral de LuCaP 23.1 como reflectido pela supressão dos níveis séricos de PSA (Fig. 9), sem diferença significativa entre os dois tratamentos. No entanto, após a interrupção do tratamento, os níveis séricos de PSA começaram a aumentar nos animais que tinham sido tratados unicamente com docetaxel, indicando um recrescimento do tumor; enquanto que foi

observada uma supressão continuada dos níveis séricos de PSA nos animais que receberam o tratamento combinado, o que indica um período prolongado de pós-tratamento com quiescência do tumor. Verificou-se que os níveis séricos de PSA se correlacionavam com a densidade óssea (DMO) os tamanhos de ossos com tumores radiografados (Fig. 9b). Na semana cinco, a densidade óssea média nos animais controle e tratados com docetaxel 20, e docetaxel 20 combinado com A12 foi  $0,112 \pm 0,01$ ,  $0,09 \pm 0,02$ , e  $0,05 \pm 0,009$  (média  $\pm$  EPM), respectivamente. Houve uma aparente tendência para uma diminuição na densidade óssea com o tratamento.

### **Exemplo 2**

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

Para experiências realizadas na presença de soro, as células foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% FBS e 50  $\mu$ g/mL de gentamicina durante 24 horas antes da exposição a medula óssea. Para experiências na ausência de soro (células subnutridas), as células foram lavadas duas

vezes com PBS, o meio de crescimento foi substituído com DMEM sem soro, e as células foram incubadas durante 4 horas antes da exposição ao preparado de medula óssea. Quando utilizado, AG-1296, um inibidor específico de receptores de PDGF (Rice et al., 1999, *Amer. J. Path.* 155, 213-21) foi adicionado às culturas 30 minutos antes da exposição ao aspirado de medula óssea. Administraram-se anticorpos IMC-3G3 anticorpos descrito nos tempos de pré-tratamento como indicado abaixo.

A activação de Akt pela medula óssea foi detectada em células PC3-ML, que expressam PDGFR $\alpha$ , mas não em células DU-145, que não têm receptor. Numa experiência, para minimizar o efeito de componentes de soro na activação de Akt, as células foram pré-incubadas durante 4 horas em meio sem soro. A adição de extractos da medula óssea resultou numa fosforilação robusta de Akt nas células PC3-ML, mas não nas células DU-145 (Fig. 10A). Para avaliar o significado da resposta, uma segunda experiência foi realizada com soro. Uma estimulação robusta da fosforilação de Akt em células PC3-ML pelo aspirado de medula óssea foi também observado na presença de soro (Fig. 10B). Apenas uma pequena resposta foi suscitada em células DU-145.

**Fosforilação de Akt mediada por PDGFR $\alpha$ .** Pensa-se que osteoblastos e osteoclastos, que secretam tanto PDGF-AA como PDGF-BB, proporcionam estes factores de crescimento no meio solúvel da medula óssea. Para determinar se a resposta das células PC3-ML aos extractos de medula óssea

era relacionada com a transdução de sinal através de PDGFR $\alpha$ , células PC3-ML foram expostas a aspirado de medula óssea na ausência ou presença de 20  $\mu$ M AG-1296. Esta concentração de AG-1296 inibe totalmente a activação de Akt induzida por PDGF-BB (Fig. 11A). AG-1296 inibiu a activação de Akt induzida por aspirado de medula óssea em mais de 40%. (Fig. 11B e D). Isto indica que a sinalização de PDGFR $\alpha$  é responsável por uma proporção significativa da activação de Akt induzida pela medula óssea.

A contribuição directa de PDGF-AA e BB para a sinalização de PDGFR $\alpha$  em relação a outros componentes dos aspirados da medula óssea foi também avaliada. Foi determinado que as concentrações de PDGF-AA e BB nos aspirados de medula óssea provenientes de três doadores diferentes variou de 400 pg/mL a 2 ng/mL. Dada a diluição de 20 vezes do aspirado de medula óssea, as células em teste estavam realmente a ser expostas a PDGF-AA e BB em concentrações entre 20 e 100 pg/mL. Assim sendo, células PC3-ML foram tratadas com 100 pg/mL de cada uma das PDGF-AA e BB. A fosforilação de Akt foi inferior a 10% do que aquela obtida com a aspirados de medula óssea. (Fig. 3C e D). Assim sendo, parece que a activação da via de Akt através da sinalização de PDGFR $\alpha$  pode envolver outros ligandos PDGFR $\alpha$ s para além de PDGF-AA e BB e/ou outros mecanismos para além da activação de PDGFR $\alpha$  por ligação directa de um ligando.

#### **Inibição da fosforilação de Akt por um anticorpo**

**anti- PDGFR $\alpha$ .** O anticorpo neutralizante IMC-3G3, que é específico para PDGFR $\alpha$  humanos também foi testado na sua capacidade de inibir a fosforilação da Akt em células PC3-ML. Um tempo de pré-incubação de 30 minutos e uma concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$  neutralizaram o efeito estimulador de 30 ng/mL de PDGF-BB (Fig. 12A). O tratamento com o anticorpo também resultou em cerca de 40% de inibição da fosforilação de Akt induzida por medula óssea (Fig. 12B e C). Também foi observado que o efeito inibitório do IMC-3G3 na fosforilação de Akt foi dependente da duração da pré-incubação, com um tempo de incubação de 120 minutos a ser significativamente mais eficaz (Fig. 12D) do que os 30 minutos de tempo de incubação (Fig. 12 B e C). Uma explicação possível é que IMC-3G3 induz a internalização de PDGFR $\alpha$ , e que o seu efeito inibitório está relacionado não só com bloqueio de ligação ao ligando, mas também com a remoção do receptor da membrana plasmática.

### **Exemplo 3**

#### **Isolamento de Anticorpos Anti-PDGFR $\alpha$ Humanos.**

Anticorpos monoclonais anti-PDGFR $\alpha$  humanos foram gerados por uma tecnologia convencional de hibridomas (Harlow & Lane, ed., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, 211-213 (1998), que está incorporada neste documento por referência), utilizando ratinhos transgênicos (Medarex Inc., Sunnyvale, CA), que expressam cadeias de imunoglobulina gama pesada e kapa leve. O domínio extracelular humano PDGFR $\alpha$  (ECD), foi adquirido de

adquirido à R&D Systems (Minneapolis, MN). Ratinhos KM foram imunizados por via subcutânea (s.c.), com  $3 \times 10^7$  células endoteliais aórticas suínas que expressam de forma estável PDGFR $\alpha$  (PAE Ra). Após 4 semanas, os ratinhos foram injectados s.c. com 50  $\mu$ g de PDGFR $\alpha$  ECD em adjuvante completo de Freund mais  $3 \times 10^7$  de células PAE Ra administradas i.p. Os ratinhos receberam reforços mais duas vezes, com intervalos de 3 semanas distante, com 25  $\mu$ g de PDGFR $\alpha$  ECD em adjuvante incompleto de Freund.

Esplenócitos de ratinhos com elevados níveis séricos de ligação e bloqueio foram isolados e fundidos com células de mieloma. As culturas de hibridomas que apresentam actividade de bloqueio foram subclonadas e anticorpos destes hibridomas foram purificados por cromatografia com proteína G.

As IgGs foram avaliadas para a ligação a PDGFR $\alpha$  num ensaio de ligação directa. Imobilizou-se PDGFR $\alpha$  ECD em PBS numa placa de 96 poços (100 ng/poço). As placas foram então lavadas com PBST (PBS + 0,05% Tween 20) e bloqueadas com PBSM (3% leite em PBS, 200  $\mu$ L/cavidade) durante 2 horas a 25°C. IgGs diluídos em PBSM foram incubados com o PDGFR $\alpha$  ECD imobilizado durante 1 h a 25°C, e as placas foram lavadas com PBST. Um anticorpo secundário (conjugado de F(ab')<sub>2</sub> IgG anti-humano de cabra-peroxidase de rábano; BioSource International, Camarillo, CA) diluído 1:5000, em PBSM foram adicionados durante 1 hora a 25°C. Após as placas serem lavadas com PBST, um substrato TMB peroxidase (KPL, Gaithersburg, MD) foi adicionado e a reacção foi



A cinética de ligação de anticorpos a PDGFR $\alpha$  foi medido utilizando um instrumento BIAcore 3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). Imobilizou-se PDGFR $\alpha$ ECD num chip de sensor e o anticorpo foi injectado em diversas concentrações. Obtiveram-se sensogramas a cada concentração e avaliou-se usando o programa BIA Evaluation 2.0 para determinar as constantes de velocidade. A constante de afinidade,  $K_d$ , foi calculada a partir da razão das constantes de velocidade  $K_{off}/K_{on}$ .

A Fig. 13 mostra a ligação dependente de dose do anticorpo monoclonal humano IMC-3G3 ao PDGFR $\alpha$ ECD imobilizado em ELISA. A concentração de anticorpo necessária para se atingir 50% do máximo de ligação a PDGFR $\alpha$  ECD foi de 0,06 nmol/L (Tabela 6). A  $ED_{50}$  é coerente com a  $K_d$  para o anticorpo como determinado pela ressonância de plasmões de superfície num instrumento BIAcore (Tabela 1). O anticorpo monoclonal também bloqueou a ligação de [ $^{125}$ I]PDGF-BB ao receptor imobilizado, com um  $IC_{50}$  de 0,43 nmol/L. Os locais de ligação para PDGF-AA e PDGF-BB em PDGFR $\alpha$  não são estruturalmente coincidentes. Os dados sugerem que o epítipo para 3G3 sobrepõe-se espacialmente com ambos os locais de ligação a factores de crescimento.

Tabela 6 - Características de ligação de anticorpo PDGFR $\alpha$					
Ligação de PDGFR $\alpha$	Bloqueio de PDGF		Cinética de ligação		
( $ED_{50}$ , nmol/L)	Fase sólida ( $IC_{50}$ , nmol/L)	Baseado em células ( $IC_{50}$ , nmol/L)	$K_{on}$ ( $10^5$ mol/L $^{-1}$ s $^{-1}$ )	$K_{off}$ ( $10^4$ s $^{-1}$ )	$K_d$ ( $10^9$ mol/L)
0,06	0,24	0,58	11,50	0,47	0,04



**Inibição da activação e fosforilação do receptor de moléculas efectoras a jusante.** Os efeitos sobre a sinalização intracelular induzidas por PDGF por IMC-3G3 foram determinados utilizando células PAE R $\alpha$ . As células foram inoculadas em placas de cultura de tecidos Falcon de seis poços (250000 células por poço) e deixaram-se a crescer durante a noite. Os poços foram lavados e, de seguida, incubados em meio sem soro. Após uma noite de incubação para tornar as células quiescentes, as células foram tratadas com anticorpos durante 30 minutos a 37°C seguida da adição de PDGF-AA ou PDGF-BB e incubação, por um período adicional 10 minutos a 37°C. As células foram então separadas e lisadas em 200  $\mu$ L de tampão de lise (50 mmol/L Tris-HCl (pH 8,0), Triton X-100 1%, NaCl 150 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, SDS 0,1%, 1 mmol/L de ortovanadato de sódio, e inibidores de protease (Complete Mini, Roche, Mannheim, Alemanha)). Os lisados celulares foram analisados por SDS-PAGE e "Western blot" usando reagentes de quimioluminescência e Hyperfilm (Amersham Biosciences).

O anticorpo foi testado para a capacidade de inibir fosforilação do receptor de tirosina induzida por ligando. PDGF-AA e PDGF-BB aumentam fosforilação de tirosina de PDGF $\alpha$  em cerca de 5 vezes a concentrações de 1 e 3 nmol/L, respectivamente. Concentrações mais altas de ligando (10 nmol/L) resultaram em menos receptor fosforilado possivelmente devido à degradação induzida pelo ligando. O anticorpo inibiu o receptor induzido por PDGF-

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

PDGFs transduzem sinais mitogénicos e exercem efeitos anti-apoptóticos em células que expressam o receptor através de proteínas efectoras a jusante. Consequentemente, o anticorpo monoclonal foi testado para a sua capacidade de inibir a activação de MAPKs p44/p42 e Akt (envolvidos nas vias de crescimento celular e anti-apoptóticas, respectivamente). O anticorpo anti-PDGFR $\alpha$  inibiu a fosforilação de ambos MAPKs e Akt em resposta a PDGF-BB (Fig. 2A) e PDGF-AA (não apresentado). A inibição de fosforilação de PDGFR $\alpha$  foi dependente da dose, conseguindo-se 50% de obtida em 0,25 nmol/L (Fig. 14B).

**Actividade anti-mitogénica.** O anticorpo monoclonal anti-PDGFR $\alpha$  foi testado pela sua capacidade de bloquear a mitogénese induzida por PDGF-AA de células PAE R $\alpha$ . As células foram inoculadas em placas de cultura de tecidos de 96-poços (1 x 10<sup>4</sup> células por poço) e crescidas durante a noite em 100  $\mu$ L de meio por poço. Os poços foram depois lavados com meio sem soro e as células foram mantidas sem soro durante a noite com 75  $\mu$ L de sem soro adicionados a cada poço. A IgG foi adicionada (25  $\mu$ L/poço) e as placas foram incubadas durante 30 minutos a 37°C. Em seguida adicionou-se PDGF-AA ou PDGF-BB (25  $\mu$ L/poço), e as placas foram incubadas durante 18 a 20 horas a 37°C. As placas foram incubadas durante mais 4 horas após cada poço

ter recebido 0,25  $\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ]timidina (25  $\mu\text{L}$ /poço). Anticorpo, PDGF, e [ $^3\text{H}$ ]timidina foram todos diluídos em meio sem soro. As células foram então lavadas com PBS mais 1% albumina de soro bovino e separadas por tratamento com tripsina (100 $\mu\text{L}$ /poço). As células foram recolhidas num filtro e lavadas três vezes com água bi-destilada usando um dispositivo de recolha de células MACH III (Tomtec, Inc., Hamden, CT). Após o processamento do filtro, a radioatividade incorporada no ADN foi determinada num contador de cintilações (Wallac Microbeta, modelo 1450).

Quando se adicionou MC-3G3 a células PAE R $\alpha$  em abstinência de soro, a incorporação de timidina induzida por PDGF-AA foi especificamente inibida (Fig. 15), com uma  $\text{EC}_{50}$  de 8,3 nmol/L. O anticorpo também inibiu a mitogénese das células PAE R $\alpha$  induzida por 3 nmol/L de PDGF-BB com uma  $\text{EC}_{50}$  de 1,25 nmol/L (dados não apresentados).

**Inibição do crescimento de linhagens de células tumorais humanas que expressam PDGFR $\alpha$ .** Linhagens de células tumorais humanas que expressam PDGFR $\alpha$  foram testadas para determinar a influência dos anticorpos anti-PDGFR $\alpha$  humanos no crescimento maligno em sistemas *in vitro* e *in vivo*. Duas dessas linhagens de células tumorais que expressam PDGFR $\alpha$ , conforme determinado por citometria de fluxo são SKLMS-1 (leiomiossarcoma) e U118 (glioblastoma). Estas linhagens celulares também respondem a ligandos em ensaios mitogénicos e formam tumores em ratinhos. SKLMS-1 tem o potencial não apenas para estimulação parácrina mas

também autócrina. Verificou-se que SKLMS-1 expressa a proteína PDGF-AA quando cultivada em cultura usando uma técnica de imunoenensaio enzimático em sanduíche quantitativo (R&D Systems).

Como se pode ver na Fig. 16A, IMC-3G3 inibiu a fosforilação de ambos Akt e MAPKs em resposta a estimulação por PDGF-AA de células SKLMS-1. A inibição da fosforilação de Akt foi 100% e a de MAPKs foi de cerca de 80%. O anticorpo é também um eficaz inibidor de fosforilação em células U118 (Fig. 16B). A mitogénese induzida por ligando de células tumorais também foi bloqueada. Quando o anticorpo anti-PDGFR $\alpha$  foi adicionado a células U118 em abstinência de soro, a incorporação de timidina induzida por PDGF-AA foi especificamente inibida (Fig. 17A) com uma EC<sub>50</sub> de 3,4 nmol/L. O anticorpo também inibiu a resposta mitogénica induzida por PDGF-AA de células SKLMS-1 com uma EC<sub>50</sub> de 5 nmol/L (Fig. 17B), bem como a resposta mitogénica induzida por PDGF-BB (Fig. 17C). Apenas a inibição parcial (40% a 66 nmol/L; Fig. 17D) de resposta mitogénica induzida por PDGF-BB foi observada para células U118. Isto é atribuído à expressão de ambos PDGFR $\alpha$  e PDGFR $\beta$  nessas células (dados não apresentados).

#### **Inibição de crescimento do xeno-enxerto tumoral.**

Testou-se IMC-3G3 *in vivo* em modelos de xeno-enxerto de glioblastoma (U118) e leiomiossarcoma (SKLMS-1) por via subcutânea (s.c.) em ratinhos atímicos imunossuprimidos. Xenoenxertos tumorais s.c. foram estabelecidos através da

injecção de  $10 \times 10^6$  de células SKLMS-1 ou de células mistas U118 em Matrigel (Collaborative Research Biochemicals, Bedford, MA) em ratinhos fêmea atímicos imunossuprimidos (Crl:NU/NU-nuBR, Charles River Laboratories, Wilmington, MA). Deixou-se os tumores atingirem um volume tumoral médio ( $\pi/6 \times \text{comprimento maior} \times \text{profundidade perpendicular}^2$ ), de aproximadamente  $400 \text{ mm}^3$ . Os ratinhos foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos (N = 12) e tratados por injecção i.p. duas vezes por semana durante o período de estudo. Os ratinhos do Grupo 1 foram tratados com o veículo controlo (0,9% NaCl, USP para Irrigação, B/Braun). Os ratinhos dos Grupos 2 a 4 foram tratados com 6, 20, e 60 mg/kg do anticorpo anti-PDGFR $\alpha$  presente. Os ratinhos do Grupo 5 foram tratados com 60 mg/kg IgG humana (Sigma). Os grupos tratados com 6, 20, ou 60 mg/kg de anticorpos anti-PDGFR $\alpha$  ou IgG humana foram administradas doses de carga de 21,4, 71,4, e 214 mg/kg, respectivamente. As doses de carga foram calculadas para atingir uma concentração plasmática em estado estacionário desde a primeira dose (meia-vida de eliminação, 7 dias), utilizando um esquema posológico de duas vezes por semana. Os volumes tumorais foram avaliados duas vezes por semana e o crescimento tumoral nos grupos de tratamento foi comparado com medições repetidas ANOVA.

Conforme mostrado na Fig. 18A, a IgG humana, não teve efeito sobre o crescimento de glioblastoma, em comparação com ratinhos tratados com solução salina (P = 0,74), enquanto que o anticorpo anti-PDGFR $\alpha$  inibiu

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

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

O exame histológico de enxertos no final do tratamento mostrou diferenças marcantes em tumores de animais tratados, em comparação com tumores de animais que receberam terapia controlo. Os tumores ressectados foram fixados em fixador QDL a 4°C durante 24 horas. Depois da incorporação em parafina e preparação de secções a 4 µm, as secções fixas com formalina foram coradas com H&E de Mayer (Richard Allen, Kalamazoo, MI).

No grupo U118 tratado com a dose mais alta (60 mg/kg), menos células tumorais viáveis foram encontradas e observaram-se substancialmente mais regiões com células esparsas em comparação com o grupo de controlo com soro (Fig. 18C). Xenoenxertos SKLMS-1 tratados no dia 25 também mostraram uma redução na quantidade de células tumorais viáveis e empacotamento celular, em comparação com o grupo de controlo com soro (Fig. 18D).

Inibição *in vitro* de estimulação mediada por PDGFR $\alpha$  de uma linhagem de glioblastoma. O nível do receptor de fosfotirosina em tumores U118 foi avaliado uma semana após o tratamento com anticorpo anti-PDGFR $\alpha$  ou IgGt humana. Ratinhos com tumores U118 estabelecidos (500 mm<sup>3</sup>) foram tratados com uma dose de carga de 214 mg/kg seguida 72 horas mais tarde por uma dose de manutenção de 60 mg/kg de anticorpos. Os tumores foram recolhidos dos ratinhos uma semana (168 horas) após a primeira injeção de anticorpo (num momento antes da regressão tumoral ser observada em média; ver Fig. 18A) e homogeneizados num tampão de lise do ensaio de fosforilação (ver acima). Os lisados foram centrifugados duas vezes a 14000 rpm e a concentração em proteínas para o sobrenadante recolhido foi determinada (ensaio de proteína Bio-Rad, Bio-Rad, Hercules, CA). O lisado (4 mg) de cada amostra foi imunoprecipitado utilizando anticorpos anti-PDGFR $\alpha$ . PDGFR $\alpha$  humanos imunoprecipitados foram então submetidos a "imunoblot" tanto com um anticorpo anti-PDGFR como anti-fosfotirosina. A Fig. 19 mostra que a administração de anticorpo anti-

PDGFR $\alpha$  resultou na redução do nível de fosfotirosina de PDGFR $\alpha$  relativa a um controlo de IgG humana nestes tumores.

**Engenharia das linhagens celulares.** Primeiro, os genes que codificam para os domínios variáveis de cadeia pesada e leve do anticorpo anti-PDGFR $\alpha$  humano foram clonados e sequenciados. Uma série de iniciadores foi obtida de MEDAREX que se ligam às sequências flanqueadoras 5' e 3' das sequências de região variável de imunoglobulina humana em hibridomas derivados de MEDAREX. A região variável de cadeia pesada amplificada com par de iniciadores AB88 (frente) e AB90 (reverso) (Tabela 7). Os produtos de cadeia leve foram amplificados com pares de iniciadores contendo o iniciador no sentido directo AB182 e o iniciador reverso AB16 (Quadro 7). Os produtos de 0,4kb destas reacções foram clonados no vector ZeroBlunt (Invitrogen) para produzir AB88-1 (V<sub>H</sub>) e AB 182-3 (V<sub>K</sub>) , e as inserções foram sequenciadas com iniciadores universais T7 e M13R.

Tabela 7 - Iniciadores para hibridomas MEDAREX			
Oligo	Tamanho	Sequência de ADN (5'-3')	SEQ ID NO
AB88	21	ATGAAACACCTGTGGTTCTTC	20
AB90	21	TGCCAGGGGGAAGACCGATGG	21
AB182	24	ATGGAA (G/A) CCCCAGCGCAGCTTCTC	22
AB16	20	CGGGAAGATGAAGACAGATG	23

De modo a gerar vectores plasmídicos para expressar o anticorpo IgG1 completo, as regiões variáveis



clonadas foram amplificadas por PCR e ligadas em duas etapas em vectores de expressão contendo genes de região constante. A amplificação primária por PCR da cadeia pesada utilizou 25 ng de plasmídeo AB88-1 como molde para iniciadores IPHF5 (directo) e IPHR5 (reverso). A amplificação secundária por PCR da cadeia pesada utilizou 5 µl de reacção primária como molde e os iniciadores OPSIF e IPHR5. A combinação dos dois iniciadores directos adiciona uma sequência de 57 pares de base à extremidade 5' dos genes de imunoglobulina que codificam para uma sequência sinal de gene de cadeia pesada de 19 aminoácidos de ratinho (MGWSCIILFLVATATGVHS; SEQ ID NO: 24) para o processamento e secreção eficiente de imunoglobulina. Além disso, o iniciador directo OPSIF acrescenta uma sequência de consenso "Kozak" (*J. Mol. Biol.* 196: 947) para um início eficiente da tradução desses genes nas células de mamífero e um local de restrição de endonuclease 5' HindIII para clonagem do produto amplificado no vector de expressão adequado. O iniciador reverso da cadeia pesada contém um local NheI em grelha para clonagem na região constante do vector.

Realizou-se a PCR em duas etapas utilizando o kit PCR Expand (Boehringer Mannheim Inc.), de acordo com especificações do fabricante utilizando o sistema Expand Buffer #3 em reacções de 50 µL com as seguintes condições de ciclo:

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

Após duas rondas de PCR, o produto foi purificado seguindo electroforese em gel de agarose e clonado como um fragmento digerido HindIII-NheI no vector pDFc (Fig. 8), que contém a região constante humana gama 1.

A amplificação por PCR primária da cadeia leve utilizou 25 ng de plasmídeo pAB182-3 como iniciadores molde IPLF4 (directo) e IPLR2 (reverso). A amplificação por PCR secundária da cadeia leve utilizou 5 µL de reacção primária como molde e os iniciadores OPSIF e IPLR2. Quanto à cadeia pesada, os dois iniciadores directos fornecem uma sequência de sinal de secreção. O iniciador reverso da cadeia primária contém um local em grelha BsiWI para a clonagem na região constante kapa do vector pLck (Fig. 8). As reacções de PCR foram realizadas como para a cadeia pesada acima. Após duas rondas de PCR, o produto foi purificado seguindo electroforese em gel de agarose e clonado em pLck, que contém a região constante da cadeia leve kapa humana.

Tabela 8 - Iniciadores para vectores de expressão de V<sub>H</sub> e V<sub>K</sub>

Tabela 8 - Iniciadores pra os vectores de expressão de V <sub>H</sub> e V <sub>K</sub>			
Oligo	Tamanho	Sequência de ADN (5'-3')	SEQ ID NO
OPSIF	53	GAGAAGCTTGCCGCCACCATGGGATGGTCATGTATCAT CCTTTTTCTAGTAGC	25
IPHF5	58	TCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTCA CAGCTGCAGCTGCAGGACTC	26
IPHR5	37	CGCGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTCCCTGG	27
IPLF4	58	TCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTCA AAATTGTGTTGACACAGTC	28
IPLR2	37	GCGCGTACGTTTGATTTCCACCTTGGTCCCTTGGCCG	29

Esta construção foi então utilizada para gerar uma linha de produção estável na linha de células de mieloma NS0. As células NS0 foram transfectadas com o plasmídeo de expressão através de electroporação usando o BioRad Gene Pulser II. Antes da transfecção, o ADN do plasmídeo foi linearizado com PvuI, precipitado com etanol, e ressuspendido numa concentração de 0,4 mg/mL (40 ug em 100 ul de dH<sub>2</sub>O). As células foram electroporadas com os 40 pg de ADN num volume final de 800 uL por um único pulso de 250 Volt, 400 µFd. As células electroporadas foram dispersas em alíquotas de 50 µL em meio DMEM (JRH Biosciences Inc.), contendo soro de vitelo fetal dialisado a 10% (dFCS) (Hyclone, Lote#: AHA7675) e 2 mM de glutamina (Invitrogen/Life Technologies) em poços de aproximadamente dezoito placas de 96 poços a uma densidade de 5000-10000 células por poço. A selecção de transfectantes positivos para a glutamina sintetase (GS) foi iniciada 24 horas depois por

meio da adição de DMEM sem glutamina contendo dFCS 10% e suplementado com 1x suplemento GS (JRH Biosciences Inc.). As células foram cultivadas durante 2-4 semanas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> para permitir o crescimento e a expansão das colónias. Mais de 300 colónias foram seleccionadas usando um ELISA de Fc (gama) anti-humana (detecção de peroxidase de rábano a A450nm). Clones que expressam anticorpos (58%) foram ampliados e reanalisados para a produtividade durante 3-5 dias de cultivo. Para adaptar células em meio livre de soro, as linhas celulares positivas foram expandidas por meio da adição de um volume igual meio de cultura GS-0S livre de soro em cada passagem. Positivos fortes, produzindo 25 ug/mL ou mais em culturas de 24 poços sub-confluentes em 3 dias, foram expandidos para uma análise mais aprofundada para adaptação completa ao meio sem soro.

Realizações adicionais incluem:

(a) Tratamentos com antagonistas IGF-IR

Um método para o tratamento de um indivíduo com um tumor ósseo que compreende a administração de uma quantidade eficaz de um antagonista IGF-IR.

Um método para a inibição do crescimento de um tumor ósseo, o qual compreende a administração de uma quantidade eficaz de um antagonista IGF-IR.

O tumor ósseo de acordo com estes métodos pode ser um tumor primário ou secundário.

O crescimento das células tumorais pode ser dependente de androgénio ou independente de androgénio.

O tumor pode ser metastizado de um cancro da próstata, um cancro da mama ou um cancro de pulmão.

Os antagonistas podem ser co-administrados com um segundo antagonista de receptor da tirosina cinase.

Os antagonistas podem ser co-administrados com uma quantidade eficaz de um agente antineoplásico. O agente antineoplásico pode ser docetaxel, doxorubicina ou radiação.

O antagonista IGF-IR pode ser um anticorpo ou um fragmento de anticorpo. Tal anticorpo ou fragmento de anticorpo pode competir para a ligação a IGF-IR com um anticorpo compreendendo um domínio variável de cadeia pesada com SEQ ID NO: 41 e um domínio variável de cadeia leve com SEQ ID NO: 51. Alternativamente, o antagonista IGF-IR pode ser um inibidor intracelular de IGF-IR e pode ser seleccionado do grupo que consiste em AG1024, NVP-AEW541, e BMS-554417.

O antagonista de IGF-IR pode inibir a ligação de IGF-I ou IGF-II a IGF-IR, neutralizar a activação de IGF-IR por IGF-I ou IGF-II, reduzir a concentração do receptor de superfície de IGF-IR, ou inibir a fosforilação de uma molécula de sinalização a jusante de IGF-IR.

O antagonista IGF-IR pode ser um anticorpo que se liga a IGF-IR com uma  $K_d$  de cerca de  $3 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1}$  ou menos.

O antagonista IGF-IR pode ser um anticorpo bi-específico. O anticorpo bi-específico pode ser específico para IGF-IR e PDGFR $\alpha$ ; ou IGF-IR e EGFR.

(b) Anticorpos PDGFR $\alpha$

Um anticorpo ou fragmento de anticorpo humano isolado específico para PDGFR $\alpha$  compreendendo uma ou mais regiões determinantes da complementaridade seleccionados do grupo que consiste em SEQ ID NO: 2 a CDR1H; SEQ ID NO: 4 a CDRH2; SEQ ID NO: 6 a CDRH3; SEQ ID NO: 10 a CDRL1; SEQ ID NO: 12 a CDRL2; e SEQ ID NO: 14 a CDR3L.

O anticorpo ou fragmento de anticorpo compreende preferentemente:

(a) SEQ ID NO: 2 a CDR1H; SEQ ID NO: 4 a CDRH2; SEQ ID NO: 6 a CDRH3; ou

(b) SEQ ID NO: 10 a CDRL1; SEQ ID NO: 12 a CDRL2; e SEQ ID NO: 14 a CDR3L.

O anticorpo ou fragmento de anticorpo compreendendo mais preferentemente SEQ ID NO: 2 a CDR1H; SEQ ID NO: 4 a CDRH2; SEQ ID NO: 6 a CDRH3; SEQ ID NO: 10 a CDRL1; SEQ ID NO: 12 a CDRL2; e SEQ ID NO: 14 a CDR3L.

O anticorpo ou fragmento de anticorpo pode compreender SEQ ID NO: 8 ou SEQ ID NO: 16 e mais preferentemente compreende SEQ ID NO: 8 e SEQ ID NO: 12.

O anticorpo ou fragmento de anticorpo pode:

- (a) ligar-se selectivamente a PDGFR $\alpha$ ;
- (b) inibir a ligação de PDGFR $\alpha$  a um ligando de PDGFR $\alpha$ ; ou
- (c) neutralizar PDGFR $\alpha$ .

O fragmento de anticorpo pode ser seleccionado do grupo que consiste num anticorpo de cadeia simples, um Fab, um Fv de cadeia simples, um diacorpo, e um triacorpo.

Uma realização adicional da invenção refere-se a um conjugado do anticorpo ou do fragmento de anticorpo discutido acima. O conjugado pode compreender um agente antineoplásico, uma porção alvo ou uma porção repórter.

Uma realização adicional da invenção refere-se a um polinucleótido que codifica para um anticorpo ou um fragmento de anticorpo e compreende uma ou mais sequências nucleotídicas seleccionadas do grupo que consiste em SEQ ID NO: 1 a CDR1H; SEQ ID NO: 3 a CDRH2; SEQ ID NO: 5 a CDRH3; SEQ ID NO: 9 a CDRL1; SEQ ID NO: 11 a CDRL2; e SEQ ID NO: 13 a CDR3L.

O polinucleótido isolado pode compreender SEQ ID NO: 7 ou SEQ ID NO: 15.

Ainda outra realização da invenção refere-se a um vector de expressão compreendendo o polinucleótido.

Ainda outra realização da invenção refere-se a uma célula hospedeira que compreende o vector de expressão. A célula hospedeira recombinante pode produzir:

(a) um polipéptido compreendendo a SEQ ID NO: 8 e um polipéptido compreendendo a SEQ ID NO: 16; ou

(b) um polipéptido compreendendo a SEQ ID NO: 8 e a SEQ ID NO: 16.

Ainda outra realização da invenção refere-se a uma quantidade eficaz do anticorpo descrito acima para utilização como um medicamento para a neutralização da activação de PDGFR $\alpha$  num mamífero.

Ainda outra realização da invenção refere-se a uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo descrito acima para utilização como um medicamento para a inibição do crescimento tumoral num mamífero. Preferentemente o anticorpo é usado para inibir o crescimento de um tumor que expressa ou sobre-expressa PDGF $\alpha$ . O tumor é preferentemente um tumor primário, um tumor metastásico, um tumor refractário ou um tumor vascularizado. Além disso, o tumor pode ser seleccionado do grupo que consiste num tumor dos ovários, um tumor da mama, um tumor do pulmão, um tumor hepatocelular, um tumor estromal gastrointestinal, um melanoma, um carcinoma de células renais, um tumor da próstata, e um sarcoma dos tecidos moles.



O anticorpo ou fragmento de anticorpo pode ser administrado em combinação com um agente antineoplásico. O agente antineoplásico é preferentemente um agente quimioterapêutico. O agente antineoplásico pode também preferentemente ser doxorubicina ou radiação.

O anticorpo ou fragmento de anticorpo pode ser administrado com um segundo antagonista de PDGFR $\alpha$ . O antagonista de PDGFR $\alpha$  é preferentemente um antagonista PDGFR $\alpha$  intracelular.

O anticorpo ou fragmento de anticorpo pode ser administrado com uma quantidade terapeuticamente eficaz de um receptor de factor de crescimento epitelial (EGFR) ou uma quantidade terapeuticamente eficaz de um antagonista de receptor de factor de crescimento semelhante à insulina (IGF-IR).

#### LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> ImClone Systems Incorporated, et al.

<120> Antagonistas dos Receptores para o Tratamento do Cancro Metastásico Ósseo

<130> 11245/54076

<140> A ser atribuído

<141> 2006-06-19

<150> 601691,920

<151> 2005-06-17

<160> 63

<170> PatenteIn versão 3.3

<210> 1  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(15)

<400> 1  
**agt agt agt tac tac** 15  
**Ser Ser Ser Tyr Tyr**  
 1 5

<210> 2  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2  
**Ser Ser Ser Tyr Tyr**  
 1 5

<210> 3  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(48)

<400> 3  
**agt ttc ttt tat act ggg agc acc tac tac aac ccg tcc ctc agg agt** 48  
**Ser Phe Phe Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser**  
 1 5 10 15

<210> 4  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 4  
**Ser Phe Phe Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser**  
 1 5 10 15

<210> 5  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(51)

<400> 5

cag tcc acg tat tac tat ggt tcg ggg aat tat tat ggc tgg ttc gac 48  
 Gln Ser Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Asn Tyr Tyr Gly Trp Phe Asp  
 1 5 10 15

cgc 51  
 Arg

<210> 6  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 6  
 Gln Ser Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Asn Tyr Tyr Gly Trp Phe Asp  
 1 5 10 15

Arg

<210> 7  
 <211> 381  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(381)

<400> 7  
 cag ctg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag cct tcg gag 48  
 Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc atc aac agt agt 96  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Ser Ser  
 20 25 30

agt tac tac tgg ggc tgg ctc cgc cag tcc cca ggg aag ggg ctg gag 144  
 Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Leu Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45

tgg att ggg agt ttc ttt tat act ggg agc acc tac tac aac ccg tcc 192  
 Trp Ile Gly Ser Phe Phe Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60

ctc agg agt cga ctc acc ata tcc gta gac acg tcc aag aac cag ttc 240  
 Leu Arg Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe

65 70 75 80  
 tcc ctg atg ctg agt tct gtg acc gcc gca gac acg gct gta tat tac 288  
 Ser Leu Met Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

tgt gcg aga cag tcc acg tat tac tat ggt tcg ggg aat tat tat ggc 336  
 Cys Ala Arg Gln Ser Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Asn Tyr Tyr Gly  
 100 105 110

tgg ttc gac cgc tgg gac cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca 381  
 Trp Phe Asp Arg Trp Asp Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 8  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 8

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

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

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

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

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

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

Cys Ala Arg Gln Ser Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Asn Tyr Tyr Gly  
 100 105 110

Trp Phe Asp Arg Trp Asp Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(33)

&lt;400&gt; 9

agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac tta gcc  
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala  
 1 5 10

33

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 10

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala  
 1 5 10

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(21)

&lt;400&gt; 11

gat gca tcc aac agg gcc act  
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
1 5

21

<210> 12  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 12  
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr  
1 5

<210> 13  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(27)

<400> 13  
cag cag cgt agc aac tgg cct ccg gcg  
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Ala  
1 5

27

<210> 14  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 14  
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Ala  
1 5

<210> 15  
<211> 321  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(321)

<400> 15

gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
 20 25 30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192  
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65 70 75 80

gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg cct ccg 288  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro  
 85 90 95

gcg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 321  
 Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 16  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 16  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 17  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Desconhecido

<220>  
 <223> péptido sintético

<400> 17  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10 15

<210> 18  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Desconhecido

<220>  
<223> péptido sintético

<400> 18  
**Gly Gly Gly Gly Ser**  
**1 . . . . . 5**

<210> 19  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Desconhecido

<220>  
<223> péptido sintético

<400> 19  
**Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser**  
**1 . . . . . 5 . . . . . 10**

<210> 20  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> artificial

<220>  
<223> iniciador sintético

<400> 20  
atgaaacacc tgtggttctt c 21

<210> 21  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> artificial

<220>  
<223> iniciador sintético

<400> 21  
tgccaggggg aagaccgatg g 21

<210> 22  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> artificial

<220>  
<223> iniciador sintético

<400> 22

atggaarccc cagcgagct tctc 24

<210> 23  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> artificial

<220>  
 <223> iniciador sintético

<400> 23  
 cgggaagatg aagacagatg 20

<210> 24  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 24  
**Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly**  
 1 5 10 15

**Val His Ser**

<210> 25  
 <211> 53  
 <212> DNA  
 <213> artificial

<220>  
 <223> iniciador sintético

<400> 25  
 gagaagcttg cggccaccat gggatggta tgtatcatcc tttttctagt agc 53

<210> 26  
 <211> 58  
 <212> DNA  
 <213> artificial

<220>  
 <223> iniciador sintético

<400> 26  
 tcctttttct agtagcaact gcaactggag tacattcaca gctgcagctg caggagtc 58

<210> 27  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> artificial

<220>  
 <223> synthetic

<400> 27  
 cgcgctagct gaggagacgg tgaccagggt tccttg 37



<210> 28  
 <211> 58  
 <212> DNA  
 <213> artificial

<220>  
 <223> iniciador sintético

<400> 28  
 tcctttttct agtagcaact gcaactggag tacattcaga aattgtggtg acacagtc 58

<210> 29  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> artificial

<220>  
 <223> sythetic primer

<400> 29  
 ggcgctacgt ttgatttcca ccttggtccc ttggccg 37

<210> 30  
 <211> 1431  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1431)

<400> 30  
 atg gga tgg tca tgt atc atc ctt ttt cta gta gca act gca act gga 48  
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
 1 5 10 15  
 gta cat tca cag ctg cag ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtg aag 96  
 Val His Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys  
 20 25 30  
 cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc tct ggt ggc tcc atc 144  
 Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile  
 35 40 45  
 aac agt agt agt tac tac tgg ggc tgg ctc cgc cag tcc cca ggg aag 192  
 Asn Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Leu Arg Gln Ser Pro Gly Lys  
 50 55 60  
 ggg ctg gag tgg att ggg agt ttc ttt tat act ggg agc acc tac tac 240  
 Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Phe Phe Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr  
 65 70 75 80  
 aac ccg tcc ctc agg agt cga ctc acc ata tcc gta gac acg tcc aag 288  
 Asn Pro Ser Leu Arg Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys

				85					90					95						
aac	cag	ttc	tcc	ctg	atg	ctg	agt	tct	gtg	acc	gcc	gca	gac	acg	gct					336
Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Met	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala					
			100					105					110							
gta	tat	tac	tgt	gcg	aga	cag	tcc	acg	tat	tac	tat	ggt	tcg	ggg	aat					384
Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gln	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Gly	Asn					
		115					120					125								
tat	tat	ggc	tgg	ttc	gac	cgc	tgg	gac	cag	gga	acc	ctg	gtc	acc	gtc					432
Tyr	Tyr	Gly	Trp	Phe	Asp	Arg	Trp	Asp	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val					
	130					135					140									
tcc	tca	gct	agc	acc	aag	ggc	cca	tcg	gtc	ttc	ccc	ctg	gca	ccc	tcc					480
Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser					
					150					155					160					
tcc	aag	agc	acc	tct	ggg	ggc	aca	gcg	gcc	ctg	ggc	tgc	ctg	gtc	aag					528
Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys					
				165					170					175						
gac	tac	ttc	ccc	gaa	ccg	gtg	acg	gtg	tcg	tgg	aac	tca	ggc	gcc	ctg					576
Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu					
			180					185					190							
acc	agc	ggc	gtg	cac	acc	ttc	ccg	gct	gtc	cta	cag	tcc	tca	gga	ctc					624
Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu					
		195					200					205								
tac	tcc	ctc	agc	agc	gtg	gtg	acc	gtg	ccc	tcc	agc	agc	ttg	ggc	acc					672
Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr					
		210				215					220									
cag	acc	tac	atc	tgc	aac	gtg	aat	cac	aag	ccc	agc	aac	acc	aag	gtg					720
Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val					
				230					235					240						
gac	aag	aga	gtt	gag	ccc	aaa	tct	tgt	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca					768
Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro					
				245					250					255						
ccg	tgc	cca	gca	cct	gaa	ctc	ctg	ggg	gga	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc					816
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe					
			260					265					270							
ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc					864
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val					
		275					280					285								
aca	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc					912
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe					
		290			295						300									
aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccg					960
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro					
				310					315					320						
cgg	gag	gag	cag	tac	aac	agc	acg	tac	cgt	gtg	gtc	agc	gtc	ctc	acc					1008
Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr					
			325					330						335						
gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	tgc	aag	gtc					1056
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val					
			340					345					350							
tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	tcc	aaa	gcc					1104
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala					



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

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
 405 410 415

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
 420 425 430

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
 435 440 445

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 450 455 460

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470 475

<210> 32

<211> 702

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(702)

<400> 32

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

gta cat tca gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg 96  
 Val His Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu  
 20 25 30

tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt 144  
 Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val  
 35 40 45

agc agc tac tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg 192  
 Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg  
 50 55 60

ctc ctc atc tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg 240  
 Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg  
 65 70 75 80

ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc 288  
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser  
 85 90 95

cta gag cct gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac 336  
 Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn  
 100 105 110

tgg cct ccg gcg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt acg 384  
 Trp Pro Pro Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr  
 115 120 125

gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag ttg 432  
 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu  
 130 135 140

aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat ccc 480  
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro  
 145 150 155 160  
 aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa tcg ggt 528  
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly  
 165 170 175  
 aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc tac 576  
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr  
 180 185 190  
 agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa cac 624  
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His  
 195 200 205  
 aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc gtc 672  
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val  
 210 215 220  
 aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag 702  
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

<210> 33  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 33  
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
 1 5 10 15  
 Val His Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu  
 20 25 30  
 Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val  
 35 40 45  
 Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg  
 50 55 60  
 Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg  
 65 70 75 80  
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser  
 85 90 95  
 Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn  
 100 105 110  
 Trp Pro Pro Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr  
 115 120 125  
 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu  
 130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro  
 145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly  
 165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr  
 180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His  
 195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val  
 210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

<210> 34  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(15)

<400> 34  
 agc tat gct atc agc 15  
 ser tyr ala ile ser  
 1 5

<210> 35  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 35  
 ser tyr ala ile ser  
 1 5

<210> 36  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(51)

<400> 36  
 ggc atc atc cct atc ttt ggt aca gca aac tac gca cag aag ttc cag 48  
 gly ile ile pro ile phe gly thr ala asn tyr ala gln lys phe gln  
 1 5 10 15

ggc 51

Gly

<210> 37  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 37  
 Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
 1 5 10 15

Gly

<210> 38  
 <211> 63  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(63)

<400> 38  
 gcg cca tta cga ttt ttg gag tgg tcc acc caa gac cac tac tac tac 48  
 Ala Pro Leu Arg Phe Leu Glu Trp Ser Thr Gln Asp His Tyr Tyr Tyr  
 1 5 10 15  
 tac tac atg gac gtc 63  
 Tyr Tyr Met Asp Val  
 20

<210> 39  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 39  
 Ala Pro Leu Arg Phe Leu Glu Trp Ser Thr Gln Asp His Tyr Tyr Tyr  
 1 5 10 15  
 Tyr Tyr Met Asp Val  
 20

<210> 40  
 <211> 390  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(390)

<400> 40  
 gag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg tcc 48  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15



tcg gtc aag gtc tcc tgc aag gct tct gga ggc acc ttc agc agc tat	96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr	
20 25 30	
gct atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg	144
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
35 40 45	
gga ggg atc atc cct atc ttt ggt aca gca aac tac gca cag aag ttc	192
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe	
50 55 60	
cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aaa tcc acg agc aca gcc tac	240
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt	288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gcg aga gcg cca tta cga ttt ttg gag tgg tcc acc caa gac cac tac	336
Ala Arg Ala Pro Leu Arg Phe Leu Glu Trp Ser Thr Gln Asp His Tyr	
100 105 110	
tac tac tac tac atg gac gtc tgg ggc aaa ggg acc acg gtc acc gtc	384
Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val	
115 120 125	
tca agc	390
Ser Ser	
130	

<210> 41  
 <211> 130  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 41	
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser	
1 5 10 15	
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr	
20 25 30	
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	
35 40 45	
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe	
50 55 60	
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr	
65 70 75 80	
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
Ala Arg Ala Pro Leu Arg Phe Leu Glu Trp Ser Thr Gln Asp His Tyr	
100 105 110	
Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val	
115 120 125	
Ser Ser	
130	

<210> 42  
 <211> 1440  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1440)

<400> 42  
 atg gga tgg tca tgt atc atc ctt ttt cta gta gca act gca act gga 48  
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
 1 5 10 15  
 gta cat tca gag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag 96  
 Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 20 25 30  
 cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga ggc acc ttc 144  
 Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe  
 35 40 45  
 agc agc tat gct atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 192  
 Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60  
 gag tgg atg gga ggg atc atc cct atc ttt ggt aca gca aac tac gca 240  
 Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala  
 65 70 75  
 cag aag ttc cag gcc aga gtc acg att acc gcg gac aaa tcc acg agc 288  
 Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser  
 85 90 95  
 aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg 336  
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110  
 tat tac tgt gcg aga gcg cca tta cga ttt ttg gag tgg tcc acc caa 384  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Leu Arg Phe Leu Glu Trp Ser Thr Gln  
 115 120 125  
 gac cac tac tac tac tac atg gac gtc tgg ggc aaa ggg acc acg 432  
 Asp His Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr  
 130 135 140  
 gtc acc gtc tca agc gcc tcc acc aag gcc cca tcg gtc ttc ccc ctg 480  
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu  
 145 150 155 160  
 gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg gcc aca gcg gcc ctg ggc tgc 528  
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys  
 165 170 175  
 ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca 576  
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
 180 185 190

ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc 624  
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser  
 195 200 205

tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc 672  
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser  
 210 215 220

ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac 720  
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn  
 225 230 235 240

acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac 768  
 Thr Lys Val Asp Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His  
 245 250 255

aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc 816  
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 260 265 270

ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc 864  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 275 280 285

cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag 912  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 290 295 300

gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag 960  
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 305 310 315 320

aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc 1008  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 325 330 335

gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag 1056  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 340 345 350

tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc 1104  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 355 360 365

tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc 1152  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 370 375 380

cca tcc ccg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg 1200  
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 385 390 400

gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat 1248  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 405 410 415

ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc 1296  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 420 425 430

gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg 1344  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 435 440 445

tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg 1392  
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 450 455 460

cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga 1440  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470 475

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 479

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 43

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
 1 5 10 15  
 Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 20 25 30  
 Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe  
 35 40 45  
 Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60  
 Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala  
 65 70 75 80  
 Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser  
 85 90 95  
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Leu Arg Phe Leu Glu Trp Ser Thr Gln  
 115 120 125  
 Asp His Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr  
 130 135 140  
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu  
 145 150 155 160  
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys  
 165 170 175  
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
 180 185 190  
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser  
 195 200 205  
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser  
 210 215 220

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn  
 225 230 235 240  
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His  
 245 250 255  
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 260 265 270  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 275 280 285  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 290 295 300  
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 305 310 315 320  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 325 330 335  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 340 345 350  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 355 360 365  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 370 375 380  
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 385 390 395 400  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 405 410 415  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 420 425 430  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 435 440 445  
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 450 455 460  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470 475

<210> 44  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(33)

<400> 44

caa gga gac agc ctc aga agc tat tat gca acc 33  
 Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Thr  
 1 5 10

<210> 45  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 45  
 Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Thr  
 1 5 10

<210> 46  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(21)

<400> 46 21  
 ggt gaa aat aag cgg ccc tca  
 Gly Glu Asn Lys Arg Pro Ser  
 1 5

<210> 47  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 47  
 Gly Glu Asn Lys Arg Pro Ser  
 1 5

<210> 48  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(33)

<400> 48 33  
 aaa tct cgg gat ggc agt ggt caa cat ctg gtg  
 Lys Ser Arg Asp Gly Ser Gly Gln His Leu Val  
 1 5 10

<210> 49  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 49  
 Lys Ser Arg Asp Gly Ser Gly Gln His Leu Val  
 1 5 10

<210> 50  
 <211> 327  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

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

<400> 50  
 tct tct gag ctg act cag gac cct gct gtg tct gtg gcc ttg gga cag 48  
 Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln  
 1 5 10 15  
 aca gtc agg atc aca tgc caa gga gac agc ctc aga agc tat tat gca 96  
 Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala  
 20 25 30  
 acc tgg tac cag cag aag cca gga cag gcc cct att ctt gtc atc tat 144  
 Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ile Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45  
 ggt gaa aat aag cgg ccc tca ggg atc cca gac cga ttc tct ggc tcc 192  
 Gly Glu Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 agc tca gga aac aca gct tcc ttg acc atc act ggg gct cag gca gaa 240  
 Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu  
 65 70 75 80  
 gat gag gct gac tac tat tgt aaa tct cgg gat ggc agt ggt caa cat 288  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Lys Ser Arg Asp Gly Ser Gly Gln His  
 85 90 95  
 ctg gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta ggt 327  
 Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105

<210> 51  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 51  
 Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala  
 20 25 30  
 Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ile Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45  
 Gly Glu Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Lys Ser Arg Asp Gly Ser Gly Gln His  
 85 90 95  
 Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105

<210> 52  
 <211> 702  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(702)

<400> 52  
 atg gga tgg tca tgt atc atc ctt ttt cta gta gca act gca act gga 48  
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

tac ccg gga gcc gtg aca gtg gcc tgg aag gca gat agc agc ccc gtc 528  
 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val  
 165 170 175

aag gcg gga gtg gag acc acc aca ccc tcc aaa caa agc aac aac aag 576  
 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
 180 185 190

tac gcg gcc agc agc tat ctg agc ctg acg cct gag cag tgg aag tcc 624  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser  
 195 200 205

cac aga agc tac agc tgc cag gtc acg cat gaa ggg agc acc gtg gag 672  
 His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu  
 210 215 220

aag aca gtg gcc cct gca gaa tgc tct tga 702  
 Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser  
 225 230

<210> 53



<211> 233  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 53  
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
 1 5 10 15  
 Val His Ser Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala  
 20 25 30  
 Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Ala Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ile Leu  
 50 55 60  
 Val Ile Tyr Gly Glu Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe  
 65 70 75 80  
 Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala  
 85 90 95  
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Lys Ser Arg Asp Gly Ser  
 100 105 110  
 Gly Gln His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 115 120 125  
 Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
 130 135 140  
 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe  
 145 150 155 160  
 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val  
 165 170 175  
 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
 180 185 190  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser  
 195 200 205  
 His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu  
 210 215 220  
 Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser  
 225 230

<210> 54  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS

<222> (1)..(33)

<400> 54

caa gga gac agc ctc aga agc tat tat gca agc 33  
Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser  
1 5 10

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser  
1 5 10

<210> 56

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 56

ggt aaa aac aac cgg ccc tca 21  
Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser  
1 5

<210> 57

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser  
1 5

<210> 58

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(33)

<400> 58

aac tcc cgg gac aac agt gat aac cgt ctg ata 33  
Asn Ser Arg Asp Asn Ser Asp Asn Arg Leu Ile  
1 5 10

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Asn Ser Arg Asp Asn Ser Asp Asn Arg Leu Ile  
 1 5 10

<210> 60  
 <211> 327  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

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

<400> 60  
 tct tct gag ctg act cag gac cct gct gtg tct gtg gcc ttg gga cag 48  
 Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln  
 1 5 10 15  
 aca gtc agg atc aca tgc caa gga gac agc ctc aga agc tat tat gca 96  
 Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala  
 20 25 30  
 agc tgg tac cag cag aag cca gga cag gcc cct gta ctt gtc atc tat 144  
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr  
 35 40 45  
 ggt aaa aac aac cgg ccc tca ggg atc cca gac cga ttc tct ggc tcc 192  
 Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 agc tca gga aac aca gct tcc ttg acc atc act ggg gct cag gcg gaa 240  
 Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu  
 65 70 75 80  
 gat gag gct gac tat tac tgt aac tcc cgg gac aac agt gat aac cgt 288  
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Asn Ser Asp Asn Arg  
 85 90 95  
 ctg ata ttt ggc ggc ggg acc aag ctg acc gtc ctc agt 327  
 Leu Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser  
 100 105

<210> 61  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 61

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

<210> 62  
 <211> 702  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(702)

<400> 62  
 atg gga tgg tca tgt atc atc ctt ttt cta gta gca act gca act gga 48  
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
 1 5 10 15  
 gta cat tca tct tct gag ctg act cag gac cct gct gtg tct gtg gcc 96  
 Val His Ser Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala  
 20 25 30  
 ttg gga cag aca gtc agg atc aca tgc caa gga gac agc ctc aga agc 144  
 Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser  
 35 40 45  
 tat tat gca agc tgg tac cag cag aag cca gga cag gcc cct gta ctt 192  
 Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu  
 50 55 60  
 gtc atc tat ggt aaa aac aac cgg ccc tca ggg atc cca gac cga ttc 240  
 Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe

65					70					75					80	
tct	ggc	tcc	agc	tca	gga	aac	aca	gct	tcc	ttg	acc	atc	act	ggg	gct	288
Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ala	
				85					90					95		
cag	gcg	gaa	gat	gag	gct	gac	tat	tac	tgt	aac	tcc	cgg	gac	aac	agt	336
Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Asn	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	
			100					105					110			
gat	aac	cgt	ctg	ata	ttt	ggc	ggc	ggg	acc	aag	ctg	acc	gtc	ctc	agt	384
Asp	Asn	Arg	Leu	Ile	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Ser	
		115				120					125					
cag	ccc	aag	gct	gcc	ccc	tcg	gtc	act	ctg	ttc	ccg	ccc	tcc	tct	gag	432
Gln	Pro	Lys	Ala	Ala	Pro	Val	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	
	130					135					140					
gag	ctt	caa	gcc	aac	aag	gcc	aca	ctg	gtg	tgt	ctc	ata	agt	gac	ttc	480
Glu	Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Phe	
	145				150					155					160	
tac	ccg	gga	gcc	gtg	aca	gtg	gcc	tgg	aag	gca	gat	agc	agc	ccc	gtc	528
Tyr	Pro	Gly	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Ser	Ser	Pro	Val	
				165					170					175		
aag	gcg	gga	gtg	gag	acc	acc	aca	ccc	tcc	aaa	caa	agc	aac	aac	aag	576
Lys	Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	Lys	
			180					185					190			
tac	gcg	gcc	agc	agc	tat	ctg	agc	ctg	acg	cct	gag	cag	tgg	aag	tcc	624
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys	Ser	
		195				200						205				
cac	aga	agc	tac	agc	tgc	cag	gtc	acg	cat	gaa	ggg	agc	acc	gtg	gag	672
His	Arg	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Glu	
	210				215						220					
aag	aca	gtg	gcc	cct	gca	gaa	tgc	tct	tga							702
Lys	Thr	Val	Ala	Pro	Ala	Glu	Cys	Ser								
	225				230											

<210> 63  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 63  
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly  
 1 5 10 15  
 Val His Ser Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala  
 20 25 30  
 Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu  
 50 55 60  
 Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe  
 65 70 75 80

Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala  
 85 90 95  
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Asn Ser  
 100 105 110  
 Asp Asn Arg Leu Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser  
 115 120  
 Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
 130 135 140  
 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe  
 145 150 155 160  
 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val  
 165 170 175  
 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
 180 185 190  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser  
 195 200 205  
 His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu  
 210 215 220  
 Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser  
 225 230

Lisboa, 31 de março de 2014

**REIVINDICAÇÕES**

1. Um antagonista PDGFR $\alpha$ , em que o referido antagonista PDGFR $\alpha$  é um anticorpo ou um seu fragmento que é específico para PDGFR $\alpha$  humano e que compreende SSSYY (SEQ ID NO:2) em CDRH1; SFFYTGSTYYNPSLRS (SEQ ID NO:4) em CDRH2; QSTYYYGSGNYYGWFDR (SEQ ID NO:6) em CDRH3; RASQSVSSYLA (SEQ ID NO:10) em CDRL1; DASNRAT (SEQ ID NO:12) em CDRL2; e QQRSNWPPA (SEQ ID NO:14) em CDRL3, para utilização no tratamento do cancro ósseo metastásico num indivíduo.

2. O antagonista de PDGFR $\alpha$  para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo ou o seu fragmento compreende um domínio variável de cadeia pesada com

QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSINSSSYWGWLQRQSPGKGLEWIGSFFY  
TGSTYYNPSLRSRLTISVDTSKNQFSLMLSSVTAADTAVYYCARQSTYYYGSGNY  
YGWFDRWDQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 8) ou um domínio variável de  
cadeia leve com  
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT  
GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPAFGQGTKVEIK (SEQ ID  
NO: 16).

3. O antagonista PDGFR $\alpha$  para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo ou o seu fragmento compreende um domínio variável de cadeia pesada com

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSINSSSYWGWLQRQSPGKGLEWIGSFFY  
 TGSTYYNPSLRSRLTISVDTSKNQFSLMLSSVTAADTAVYYCARQSTYYYYGSGNY  
 YGWFDRWDQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 8) e um domínio variável de  
 cadeia leve com  
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT  
 GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPAFGQGTKVEIK (SEQ ID  
 NO: 16).

4. O antagonista PDGFR $\alpha$  para utilização de acordo com a reivindicação 3, em que o anticorpo ou seu fragmento compreende uma cadeia pesada com

MGWSCIIILFLVATATGVHSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSINSSSYWG  
 WLRQSPGKGLEWIGSFFYTGSTYYNPSLRSRLTISVDTSKNQFSLMLSSVTAADT  
 AVYYCARQSTYYYYGSGNYGWFDRWDQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS  
 GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPVAVLQSSGLYSLSVVTVPS  
 SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHCTCPPELGGPSVFLFPPKPK  
 KTDITLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFN\VAVDGVEVI3NAKTKTREEQYNSTY  
 RVVSVLTVLHQDWLNGKJiYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR  
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL  
 TVDKSRWQOGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:31) e uma  
 cadeia leve com  
 MGWSCIIILFLVATATGVHSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ  
 QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSN  
 WPPAFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW  
 KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS  
 SPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:33).

5. O antagonista PDGFR $\alpha$  para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em

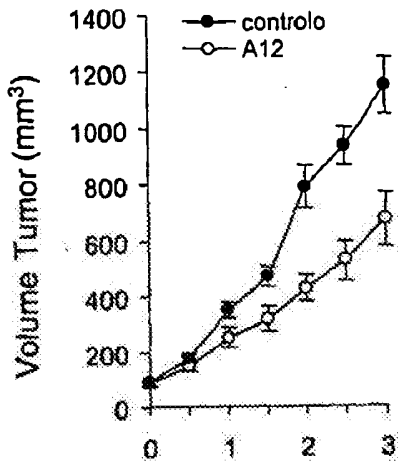


que o tumor é metastizado de um cancro da próstata, de cancro a mama ou de cancro do pulmão.

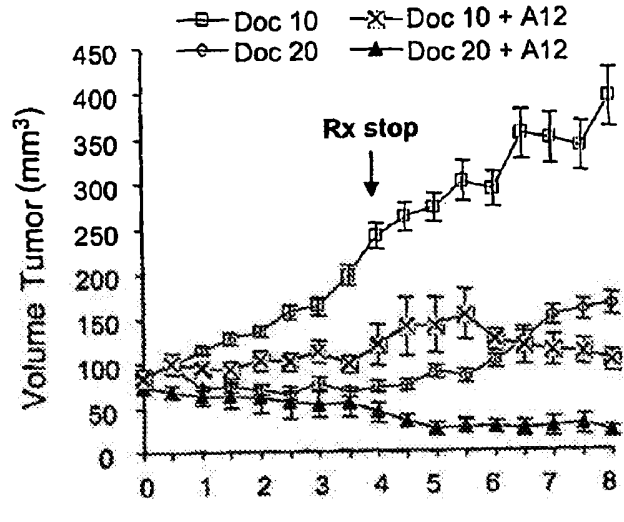
6. O antagonista PDGFR $\alpha$  para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que o anticorpo ou o seu fragmento inibe a ligação de PDGFR $\alpha$  ou neutraliza PDGFR $\alpha$ .

Lisboa, 31 de março de 2014

a.

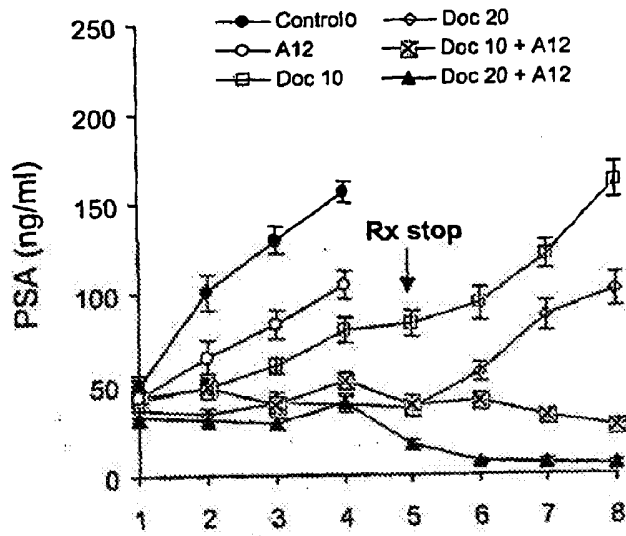


D.



Semanas após início do tratamento

C.



Semanas após início do tratamento

Fig. 1

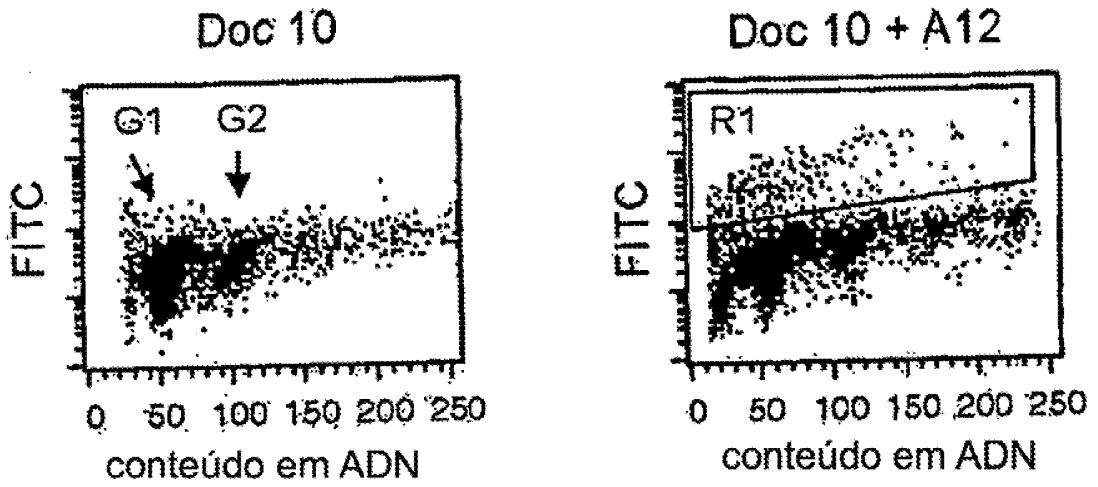


Fig. 2

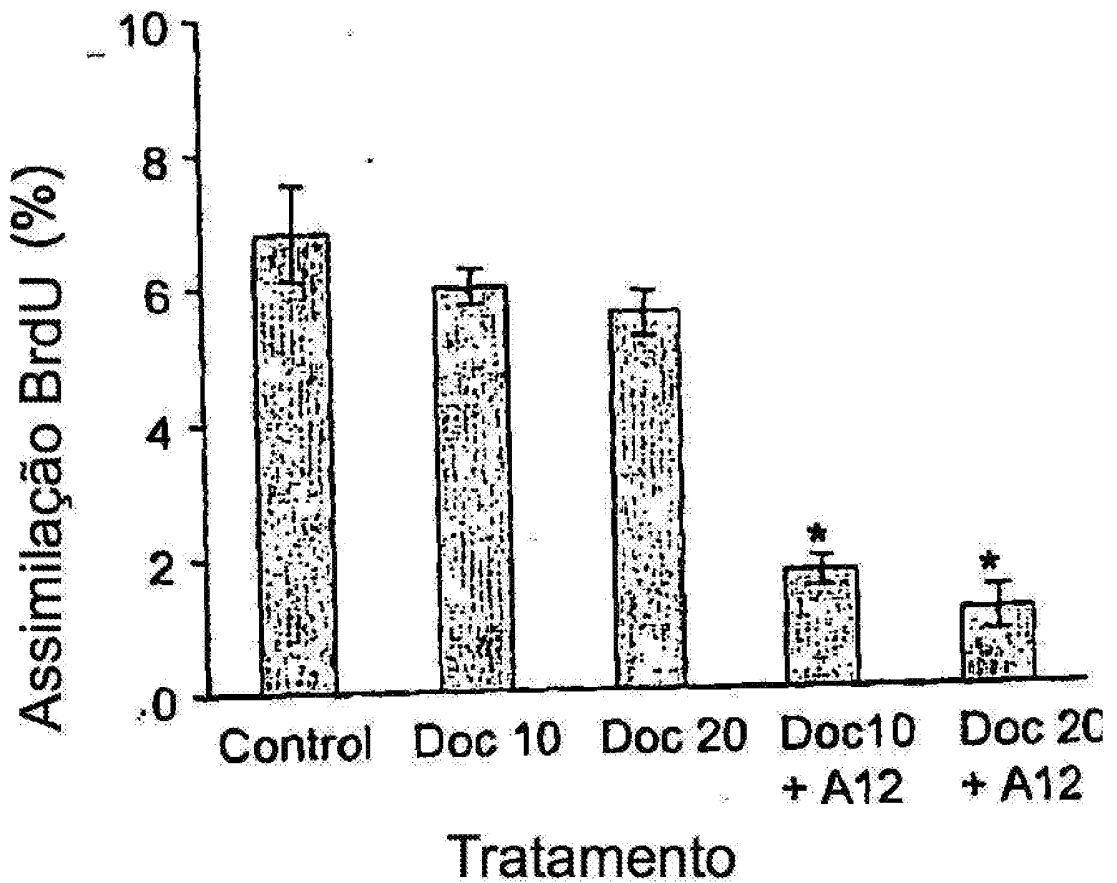


Fig. 3

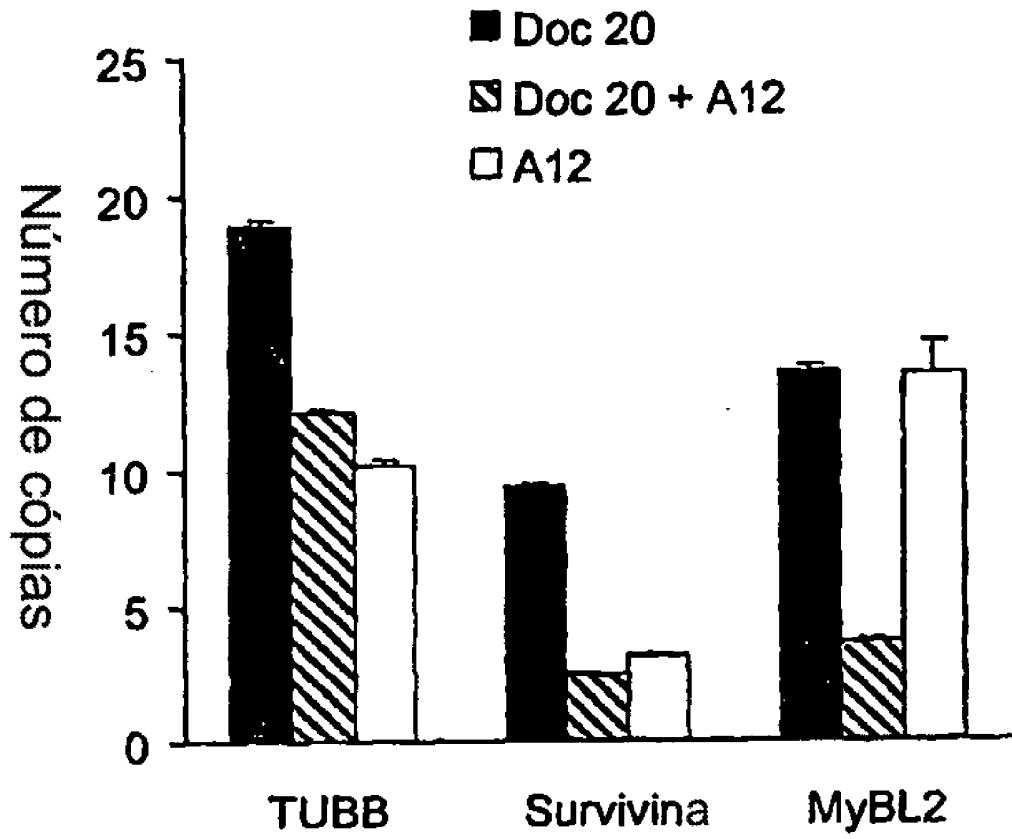


Fig. 4

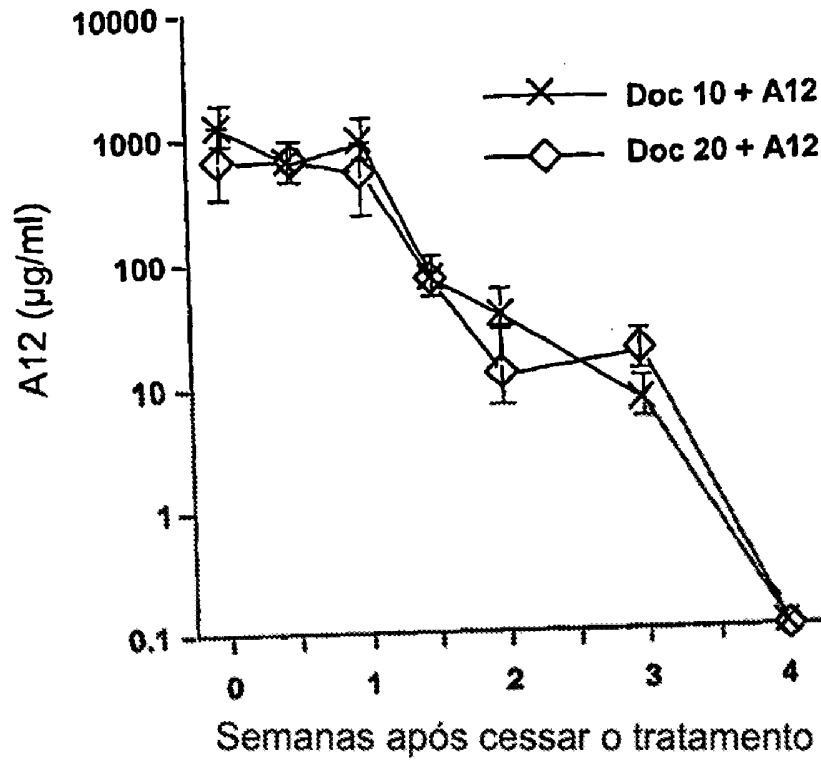


Fig. 5

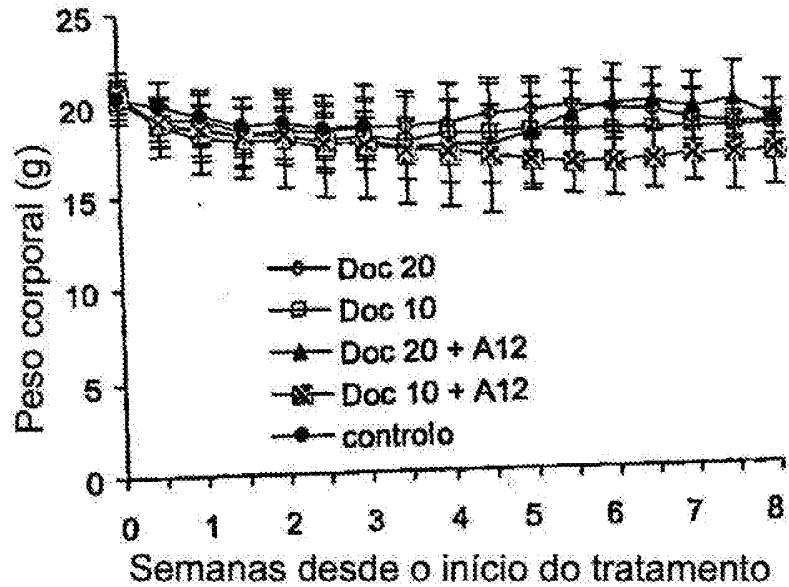


Fig. 6

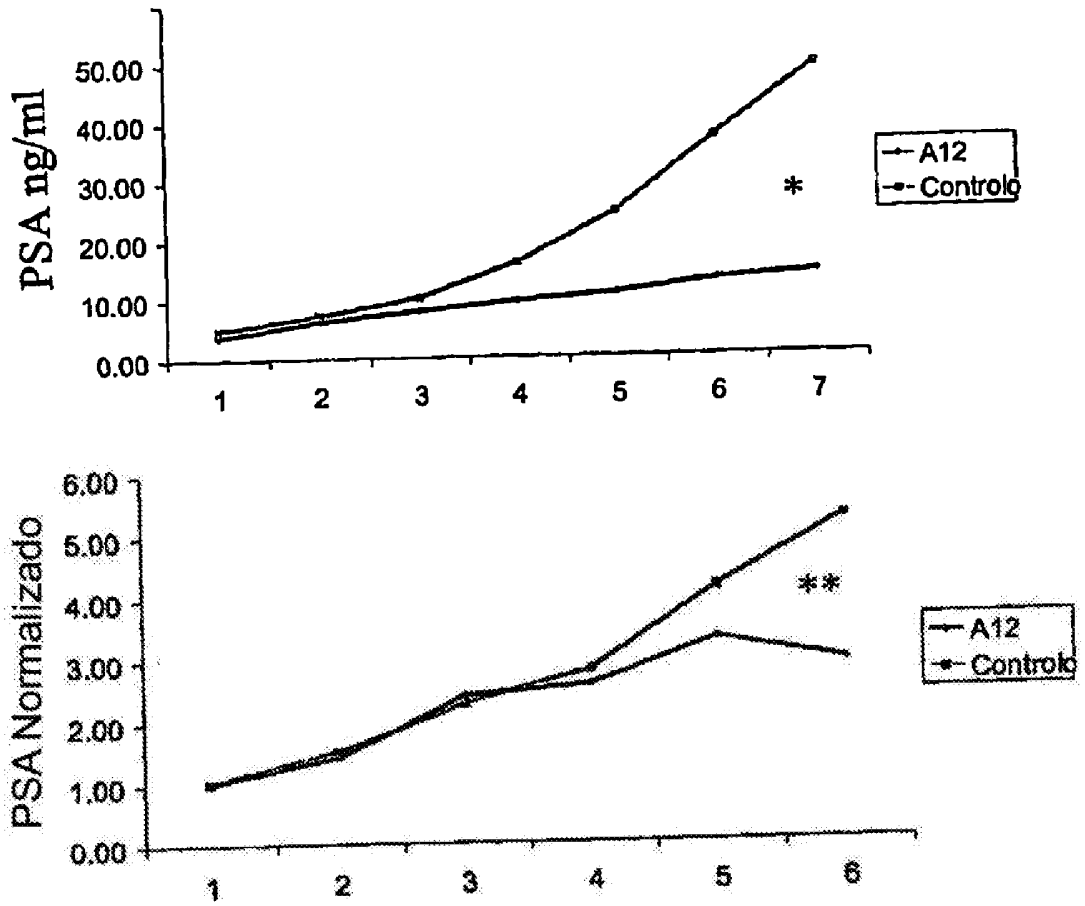


Fig. 7

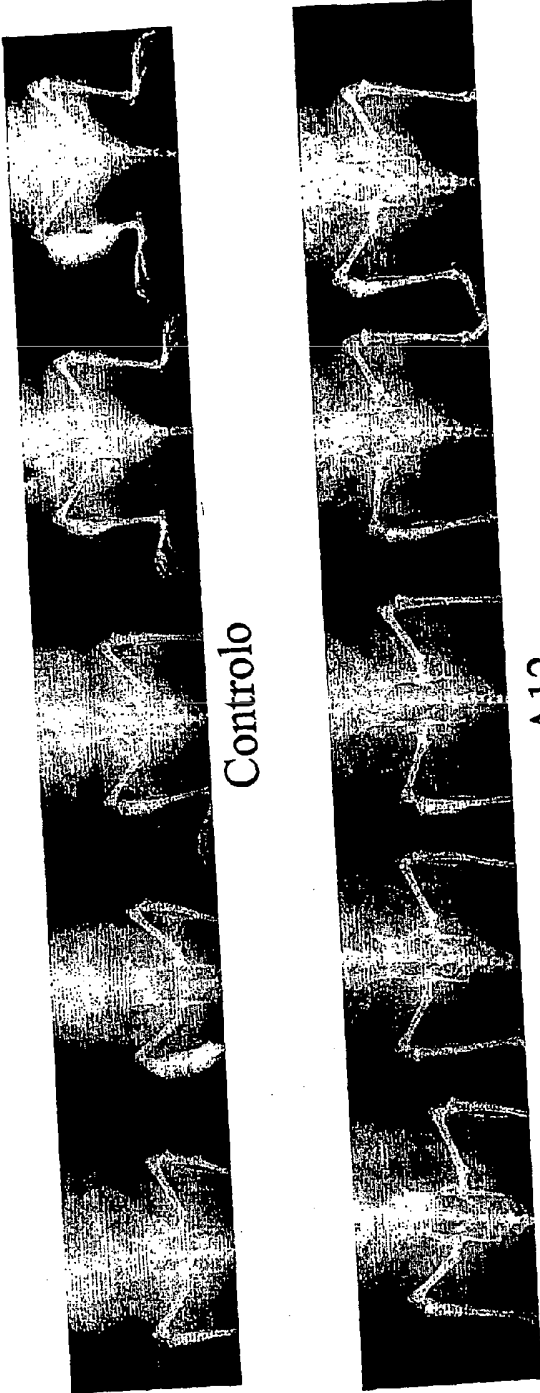
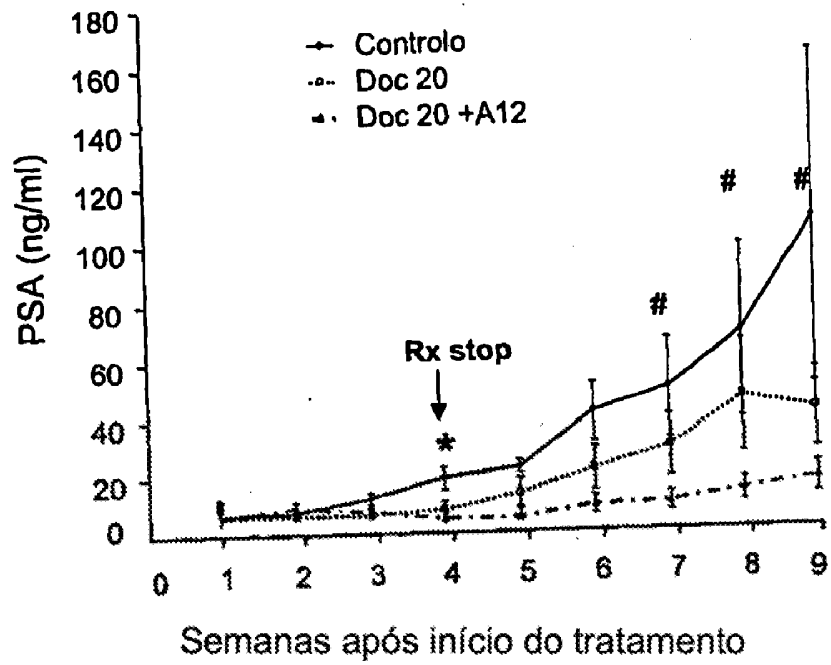
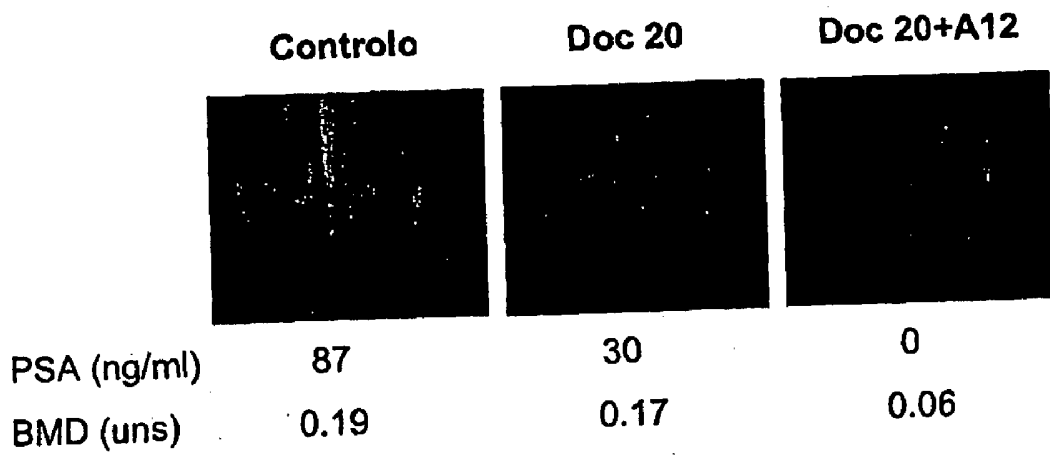


Fig. 8

**a.**



**b.**



**Fig. 9**



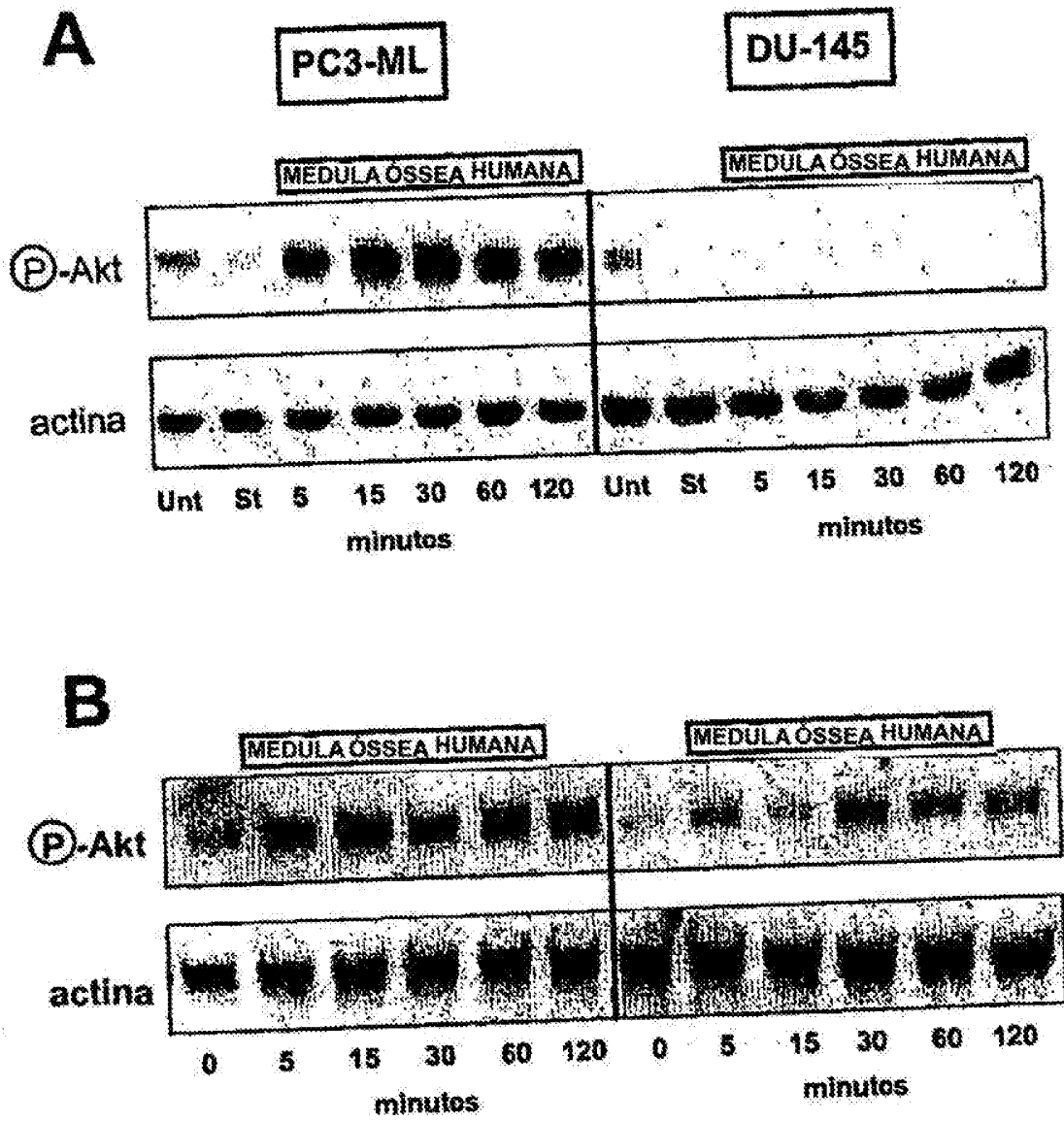


Fig. 10

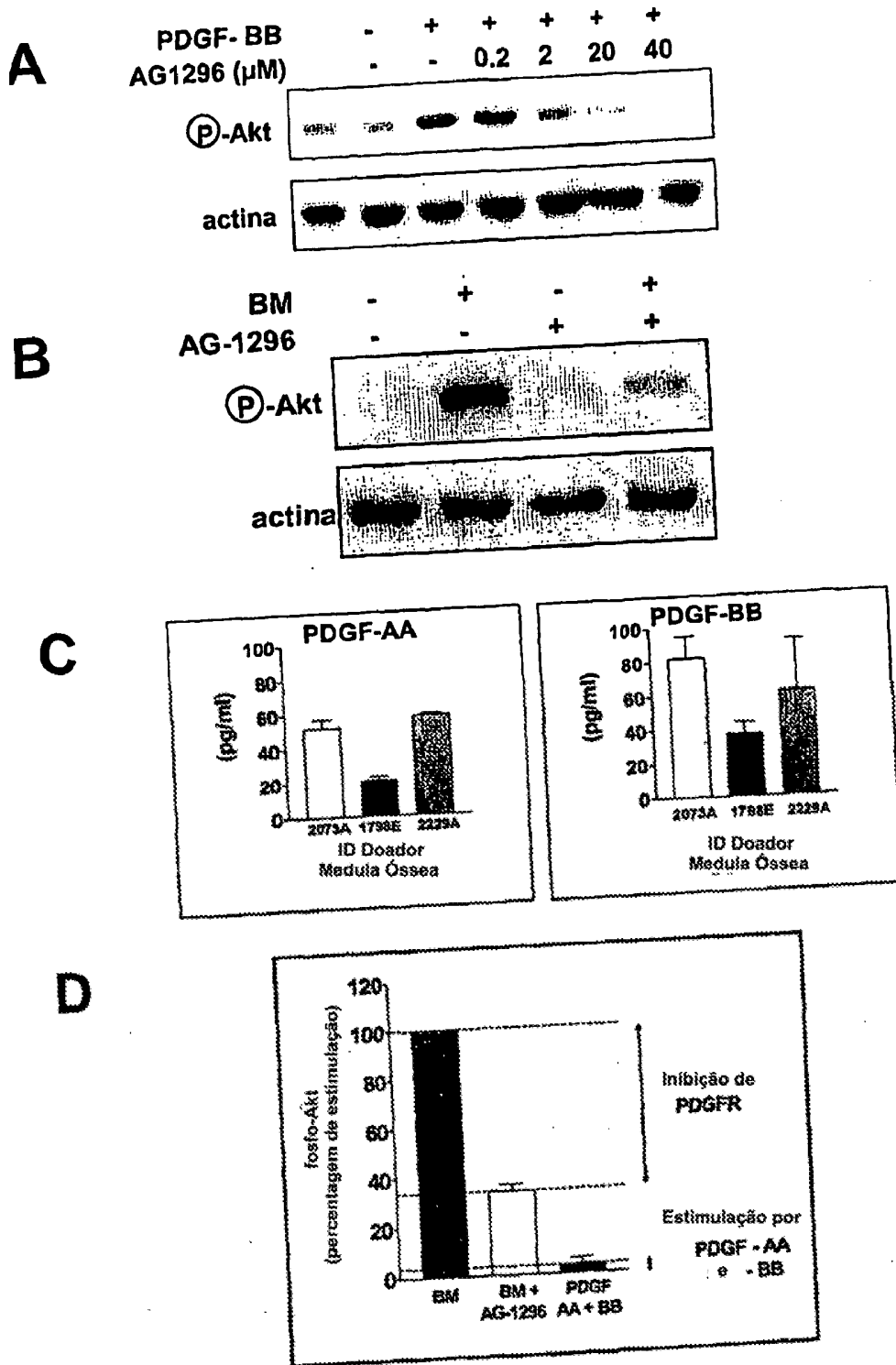


Fig. 11

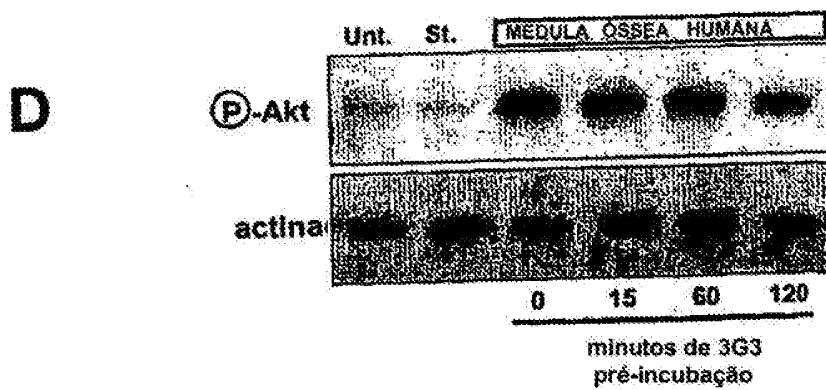
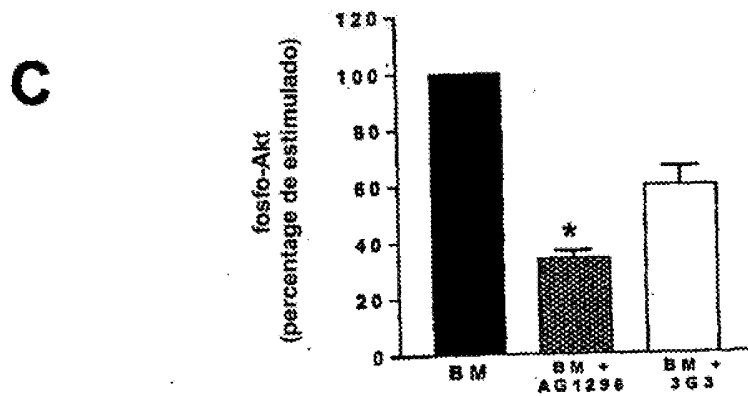
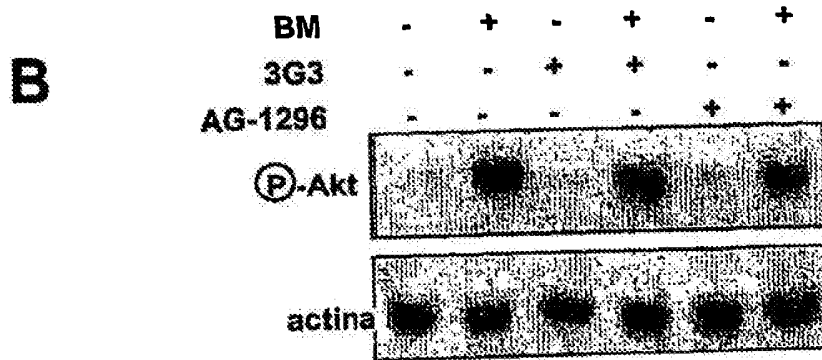
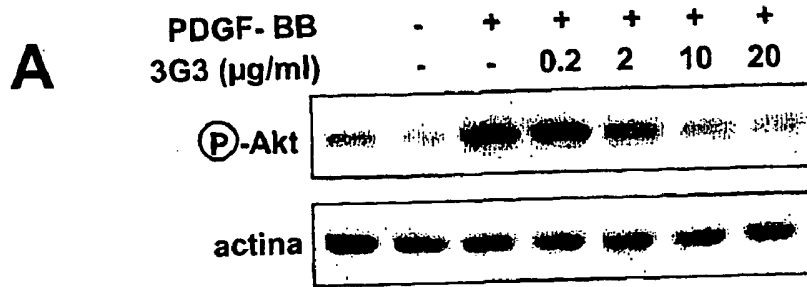
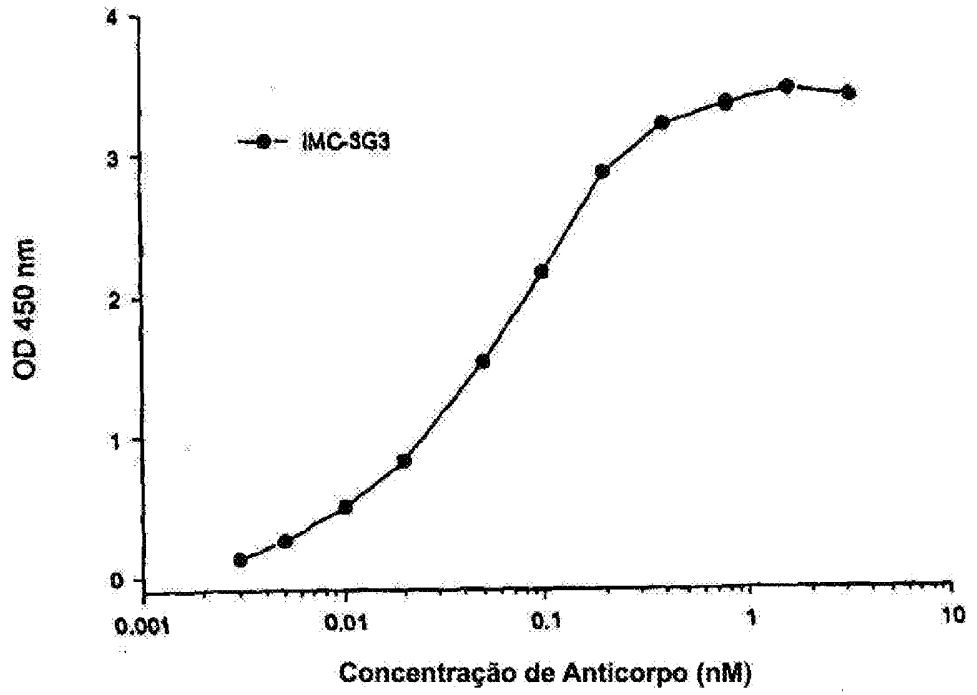
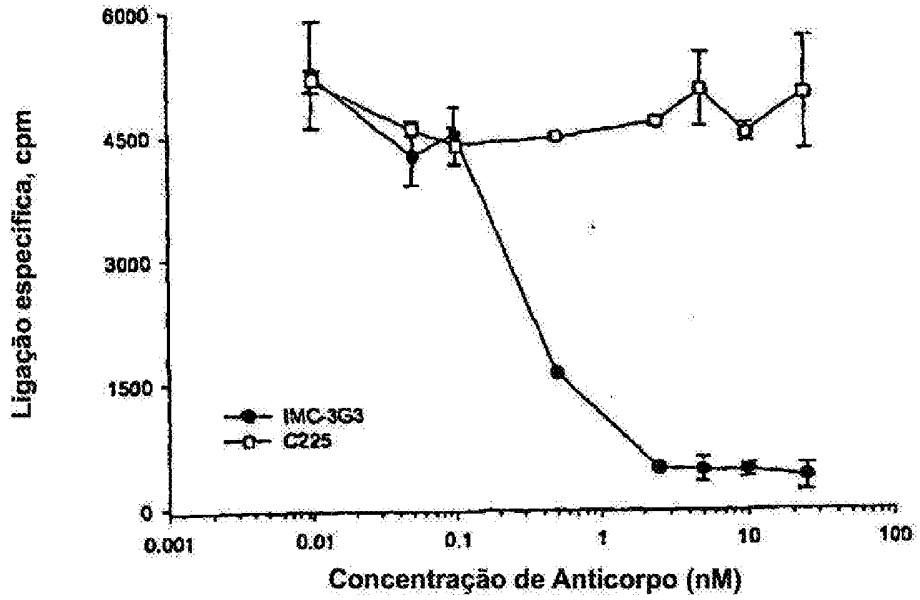


Fig. 12

**A**



**B**



**Fig. 13**

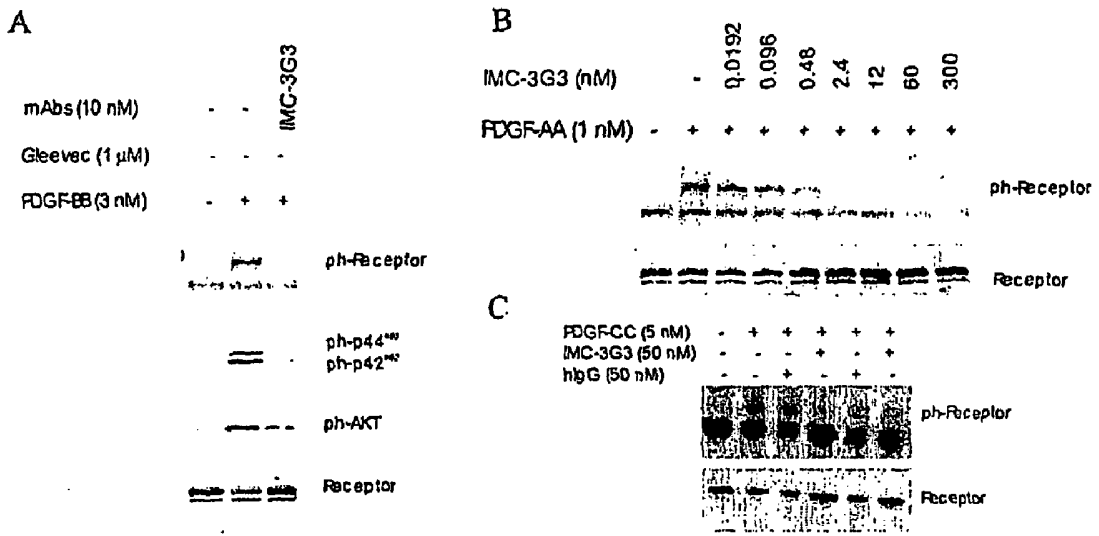


Fig. 14

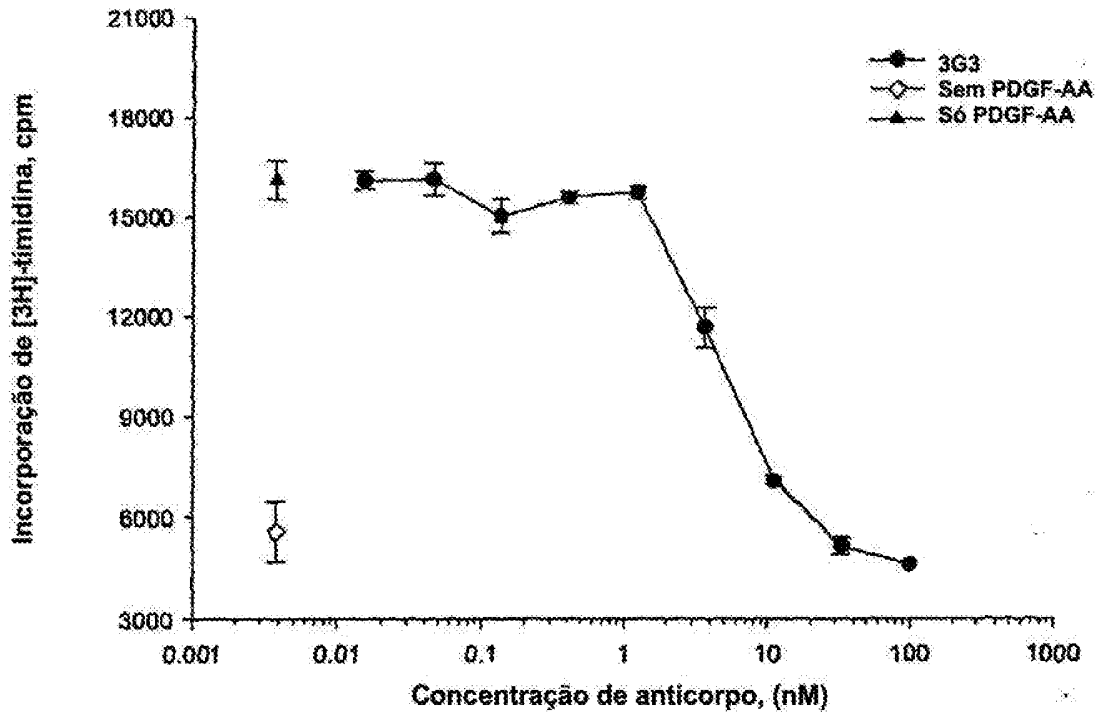


Fig. 15

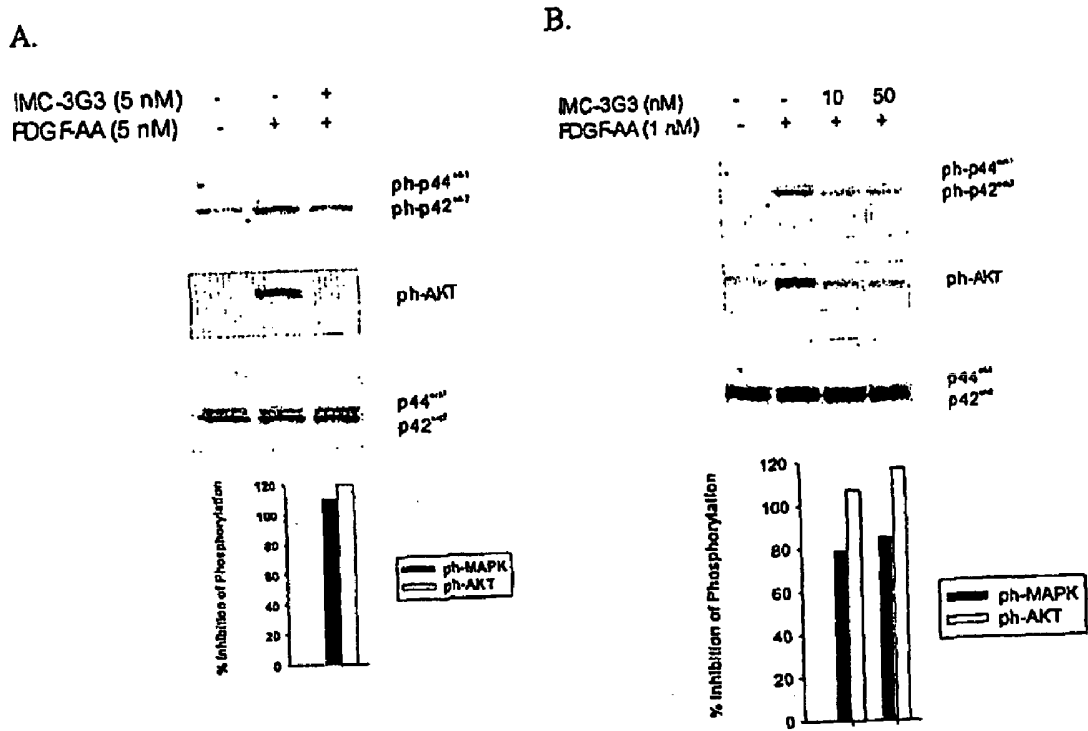


Fig. 16

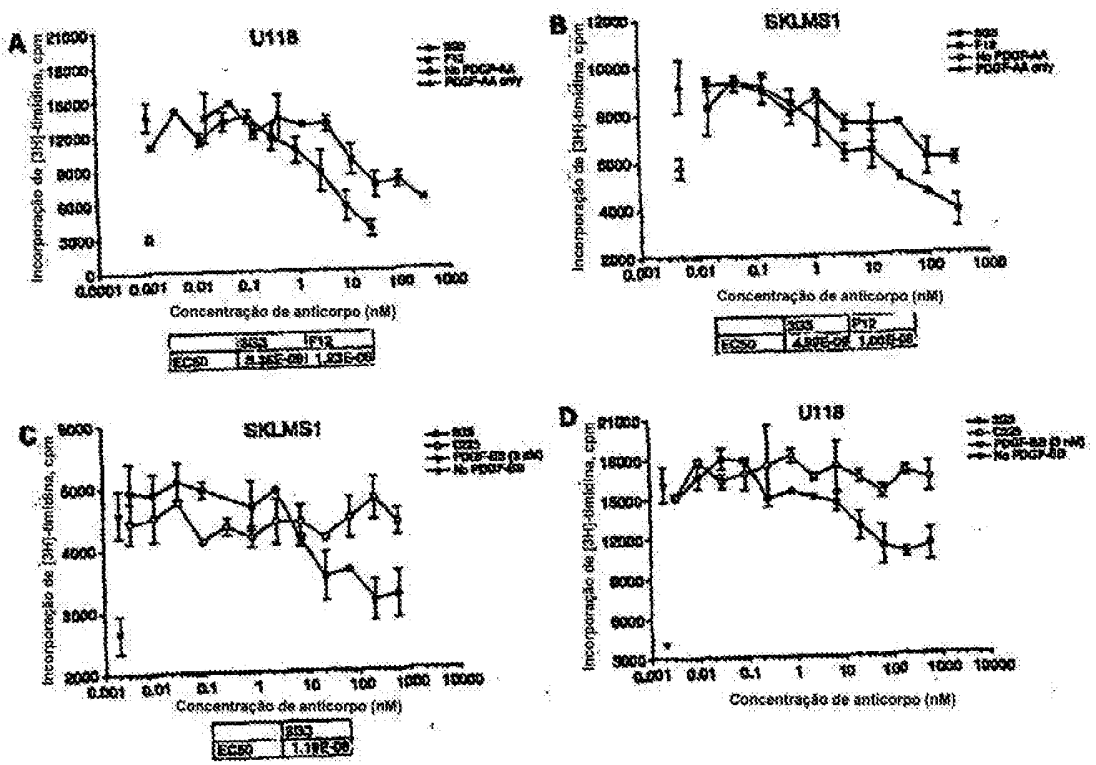


Fig. 17

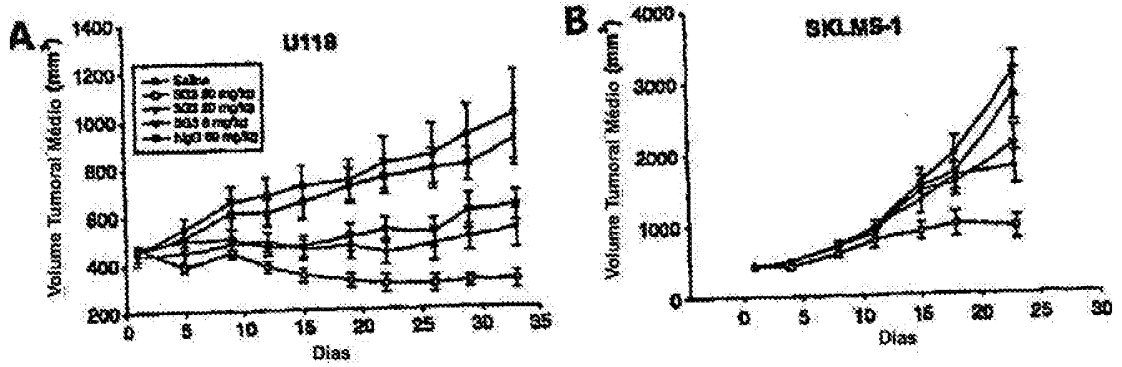


Fig. 18

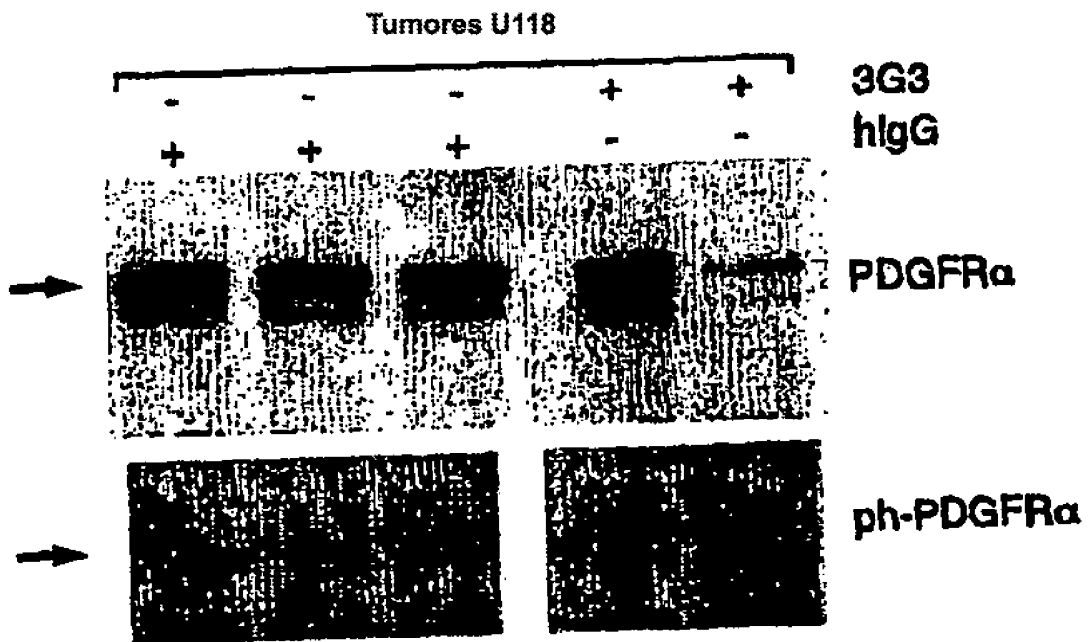


Fig. 19

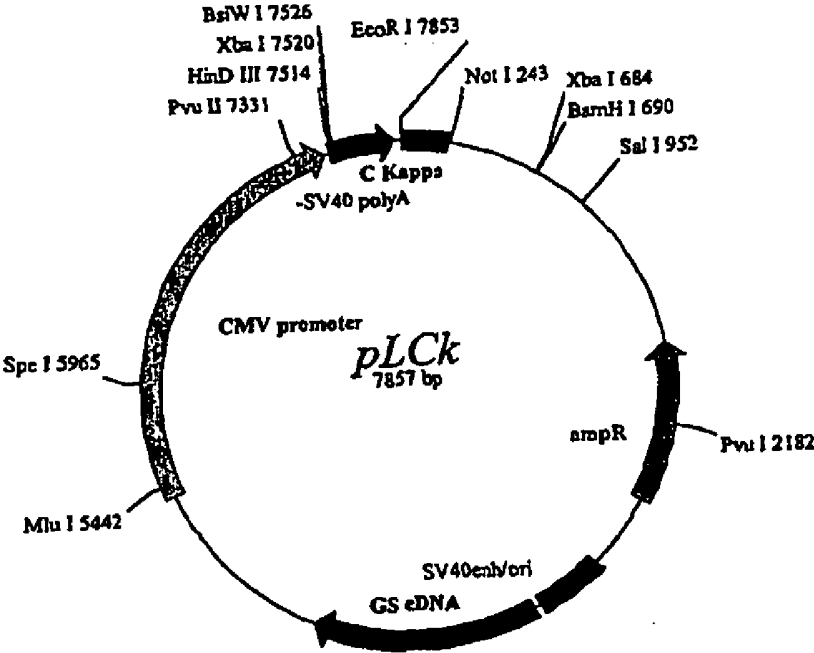


Fig. 20



## REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

### Documentos de patentes citadas na Descrição

- US 691920 P
- WO 2005016970 A
- WO 9321319 A
- EP 239400 A
- WO 8909622 A
- EP 338745 A
- EP 332424 A
- US 6217666 B, Schlessinger
- WO 9960023 A, Waksal
- WO 0180192 A
- WO 200602025 A
- US 5618582 A
- WO 9633980 A
- WO 9630347 A
- WO 91116061 A
- WO 9727199 A
- WO 9730034 A
- WO 9742187 A
- WO 9749688 A
- WO 9833798 A
- WO 0018761 A
- WO 0031048 A
- US 5679683 A
- US 5196446 A
- WO 03075840 A
- US 60691920 B

### Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- PETRYLAK et al. *N. Engl. J. Med.*, 2004, vol. 351, 1513
- TANNOCK et al. *N. Engl. J. Med.*, 2004, vol. 351, 1502
- ADAMS et al. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2000, vol. 57, 1050-93
- BASERGA. *Oncogene*, 2000, vol. 19, 5574-81
- PANDINI et al. *Clin. Canc. Res.*, 1999, vol. 5, 1935-19
- SIDDLE ; SOOS. *The IGF System*. Humana Press, 1999, 199-225
- OATES et al. *Breast Cancer Res. Treat.*, 1998, vol. 47, 269-81
- BYRD et al. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, 24408-16
- YU, H. ; ROHAN, J. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000, vol. 92, 1472-89
- PANEK et al. *J. Pharmacol. Exp. Thera.*, 1997, vol. 283, 1433-44
- BATLEY et al. *Life Sci.*, 1998, vol. 62, 143-50
- GRANDIS et al. *Cancer*, 1996, vol. 78, 1284-92
- SHIMIZU et al. *Japan J. Cancer Res.*, 1994, vol. 85, 567-71
- SAUTER et al. *Am. J. Path.*, 1996, vol. 148, 1047-53
- COLLINS. *Glia*, 1995, vol. 15, 289-96
- RADINSKY et al. *Clin. Cancer Res.*, 1995, vol. 1, 19-31
- PETRIDES et al. *Cancer Res.*, 1990, vol. 50, 3924-39
- HOFFMANN et al. *Anticancer Res.*, 1997, vol. 17, 4419-26
- WIKSTRAND et al. *Cancer Res.*, 1995, vol. 55, 3140-48
- BURTRUM et al. *Cancer Res.*, 2003, vol. 63, 8912-21
- LAMOYI et al. *J. Immunol. Methods*, 1983, vol. 56, 235-243
- PARHAM. *J. Immunol.*, 1983, vol. 131, 2995-2902
- STINCHCOMB et al. *Nature*, 1979, vol. 282, 39
- KINGSMAN et al. *Gene*, 1979, vol. 7, 141
- JONES. *Genetics*, 1977, vol. 85, 12
- *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, 1998, 211-213
- P.J. SOUTHERN ; P. BERG. *J. Mol. Appl. Genet.*, 1982, vol. 1, 327-341
- SUBRAMANI et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1981, vol. 1, 854-864
- KAUFMANN ; SHARP. *Amplification And Expression of Sequences Cotransfected with a Modular Dihydrofolate Reductase Complementary DNA Gene*. *J. Mol. Biol.*, 1982, vol. 159, 601-621
- KAUFMANN ; SHARP. *Mol. Cell. Biol.*, 1982, vol. 159, 601-664
- SCAHILL et al. *Expression And Characterization Of The Product Of A Human Immune Interferon DNA Gene In Chinese Hamster Ovary Cells*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 4654-4659
- URLAUB ; CHASIN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216-4220

- SHOKRI et al. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2003, vol. 60 (6), 654-64
- NIELSEN et al. *Prot. Eng.*, 1997, vol. 10, 1-6
- VON HEINJE et al. *Nucl. Acids Res.*, 1986, vol. 14, 4683-4690
- HERMENTIN ; SEILER. *Behring Inst. Mitt.*, 1988, vol. 82, 197-215
- PEDLEY et al. *Br. J Cancer*, 1993, vol. 68, 69-73
- ROWINSKY et al. *Abstract 5 presented at the 37th Annual Meeting of ASCO, San Francisco, CA, 12 May 2001*
- MOYER et al. *Cancer Res.*, 1997, vol. 57, 4838-48
- POLLACK et al. *J. Pharmacol.*, 1999, vol. 291, 739-48
- SAMBROOK, J et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- COLIGAN, J. et al. *Current Protocols in Immunology*. Wiley & Sons, 1994
- ENNA, S.J. et al. *Current Protocols in Pharmacology*. Wiley & Sons, 1991
- BONIFACINO, J.S. et al. *Current Protocols in Cell Biology*. Wiley & Sons, 1999
- TANAKA et al. *Int. J. Cancer*, 2004, vol. 111, 617-26
- DE ANGELIS et al. *Int. J. Oncol.*, 2004, vol. 24, 1279-88
- ZHANG et al. *Oncogene*, 2005, vol. 24, 2474-82
- LOUGHRAN et al. *Oncogene*, 2005, vol. 24, 6185-93
- GRIMBER et al. *J. Cell. Physiol.*, 2000, vol. 183, 1-9
- RICE et al. *Amer. J. Path.*, 1999, vol. 155, 213-21
- DUAN et al. *J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, 413-8
- HELDIN et al. *EMBO J.*, 1988, vol. 7, 1387-93