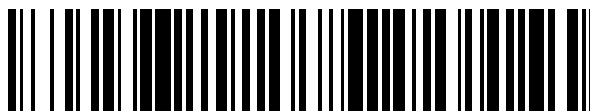


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 452 115**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2006 E 09075102 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2014 EP 2100618**

54 Título: **Un anticuerpo anti-PDGFRalfa para su uso en el tratamiento de cáncer de huesos metastásico**

30 Prioridad:

17.06.2005 US 691920 P

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

31.03.2014

73 Titular/es:

**IMCLONE LLC (50.0%)
450 East 29th Street, 12th Floor
New York, NY 10016, US y
PHILADELPHIA HEALTH AND EDUCATION
CORPORATION D/B/A DREXEL UNIVERSITY
COLLEGE OF MEDICINE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LOIZOS, NICK;
DOLLOFF, NATHAN GRAEME y
FATATIS, ALESSANDRO**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 452 115 T3

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

DESCRIPCIÓN

Un anticuerpo anti-PDGFR α para su uso en el tratamiento de cáncer de huesos metastásico

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. nº 60/691.920.

Campo de la invención

- 5 La divulgación proporciona procedimientos para tratar cáncer de huesos, particularmente cáncer de huesos metastásico, administrando un antagonista de IGF-IR y/o un antagonista de PDGFR α . La presente divulgación también proporciona anticuerpos que se unen a PDGFR α humano y neutralizan la activación del receptor. La presente divulgación proporciona además procedimientos para neutralizar la activación de PDGFR α , y procedimientos para tratar un mamífero con una enfermedad neoplásica usando los anticuerpos solos o en combinación con otros agentes.

10 **Antecedentes de la invención**

El cáncer de próstata es el cáncer más común entre los hombres, con aproximadamente 220.000 casos y 29.000 muertes anualmente en los Estados Unidos. Una proporción significativa de hombres diagnosticados con cáncer de próstata tienen enfermedad metastásica. Además, las metástasis se desarrollan eventualmente en muchos otros pacientes con cáncer de próstata a pesar de tratamiento con cirugía o radioterapia. El hueso es el sitio más común de metástasis del cáncer de próstata, y también es un sitio al que frecuentemente metastatizan cánceres de mama y cánceres de pulmón. La mayoría de las metástasis del cáncer de próstata son dependientes de andrógenos, de manera que hay una rápida respuesta a castración quirúrgica o médica, pero en prácticamente todos los pacientes, el tumor se vuelve eventualmente independiente de andrógenos, conduciendo a morbilidad y mortalidad significativas. Una vez se producen las metástasis al hueso, las terapias actualmente disponibles tienen efecto limitado. La terapia aprobada más eficaz que se ha descrito para cáncer de próstata metastásico (administración de docetaxel) prolonga la mediana de la supervivencia aproximadamente tres meses. (Petrlak y col., 2004, N. Engl. J. Med. 351:1513; Tannock y col., 2004, N. Engl. J. Med. 351:1502) Por consiguiente, se necesitan urgentemente nuevas terapias para cánceres de huesos metastásicos.

25 El factor de crecimiento similar al receptor de la insulina (IGF-IR) es un receptor de tirosina cinasas transmembrana ubicuo que es esencial para el crecimiento y desarrollo normal fetal y post-natal. El IGF-IR se localiza sobre la superficie celular de la mayoría de los tipos de células y sirve de molécula de señalización para los factores de crecimiento IGF-I y IGF-II (conjuntamente llamados en adelante IGF). El IGF-IR puede estimular la proliferación celular, diferenciación celular, cambios en el tamaño de células y proteger células de la apoptosis. También se ha considerado que es casi obligatorio para la transformación celular (revisado en Adams y col., Cell. Mol. Life Sci. 57:1050-93 (2000); Baserga, Oncogene 19:5574-81 (2000)). Se ha informado de altos niveles de expresión de IGF-IR en muestras de tejido de metástasis al hueso de cáncer de próstata. El hueso contiene el mayor almacén de IGF en el cuerpo.

35 El IGF-IR es un heterotetrámero preformado que contiene dos cadenas alfa y dos beta covalentemente ligadas por enlaces disulfuro. Las subunidades de receptor se sintetizan como parte de una única cadena de polipéptidos de 180 kd, que luego se procesa proteolíticamente en subunidades alfa (130 kd) y beta (95 kd). La cadena alfa entera es extracelular y contiene el sitio para la unión a ligando. La cadena beta posee el dominio transmembrana, el dominio de tirosina cinasa y una extensión del extremo C que es necesaria para la diferenciación y transformación celular, pero es dispensable para la señalización y protección de mitógeno de la apoptosis.

40 El IGF-IR es altamente similar al receptor de insulina (IR), particularmente dentro de la secuencia de la cadena beta (70 % de homología). Debido a esta homología, estudios recientes han demostrado que estos receptores pueden formar híbridos que contienen un dímero de IR y un dímero de IGF-IR (Pandini y col., Clin. Canc. Res. 5:1935-19 (1999)). La formación de híbridos se produce en tanto células normales como transformadas y el contenido de híbrido depende de la concentración de los dos receptores de homodímero (IR y IGF-IR) dentro de la célula. Aunque los receptores de híbrido están compuestos por pares de IR y IGF-IR, los híbridos se unen selectivamente a IGF, con afinidad similar a la de IGF-IR, y solo se unen débilmente a insulina (Siddle y Soos, The IGF System. Humana Press. pág. 199-225. 1999).

45 Por tanto, estos híbridos pueden unirse a IGF y transducir señales en tanto células normales como transformadas.

Un segundo receptor de IGF, IGF-IIR, o receptor de manosa-6-fosfato (M6P), también se une a ligando de IGF-II con alta afinidad, pero carece de actividad de tirosina cinasas (Oates y col., Breast Cancer Res. Treat. 47:269-81 (1998)). Debido a que produce la degradación de IGF-II, se considera un sumidero para IGF-II, antagonizando los efectos promotores del crecimiento de este ligando. La pérdida de IGF-IIR en células tumorales puede potenciar el potencial de crecimiento mediante la liberación de su efecto antagonista sobre la unión de IGF-II con IGF-IR (Byrd y col., J. Biol. Chem. 274:24408-16 (1999)).

Los receptores alfa y beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR α y PDGFR β) son tirosina cinasas de receptor tipo III. PDGFR α es crítico para el desarrollo y satisface importantes funciones en la edad adulta. Por ejemplo, ratones homocigóticos para una mutación nula mueren durante la embriogénesis. En etapas tardías del

desarrollo, PDGFR α se expresa en muchas estructuras mesenquimatosas, mientras que células epiteliales adyacentes producen factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF). Las muestras de tejido de glándulas prostáticas normales o hiperplásicas dan negativo para PDGFR α , mientras que tumores de próstata primarios y masas esqueléticas de sujetos similares expresan PDGFR α . Además de líneas celulares de próstata obtenidas de diferentes sitios metastásicos, PDGFR α se encuentra en células PC3 derivadas de metástasis al hueso, pero no en líneas celulares obtenidas de metástasis al ganglio linfático (LNCaP) y cerebro (DU-145).

La familia de factores de crecimiento derivados de plaquetas de factores de crecimiento consiste en cinco dímeros ligados por disulfuro diferentes, PDGF-AA, -BB, -AB, -CC y -DD, que actúan mediante PDGFR α y PDGFR β . Estos factores de crecimiento son moléculas díméricas compuestas por cadenas de polipéptidos ligadas por disulfuro que se unen a dos proteínas de receptor simultáneamente e inducen la dimerización de receptores, autofosforilación y señalización intracelular. PDGFR α y PDGFR β son estructuralmente similares y pueden formar heterodímeros, además de homodímeros. Debido a que PDGFR β no se une a la cadena de PDGF-A con alta afinidad, PDGF-AA activa solo dímeros de receptores $\alpha\alpha$, mientras que PDGF-AB y PDGF-CC activan heterodímeros de receptores $\alpha\alpha$ y $\alpha\beta$.

Breve resumen de la invención

La presente divulgación se refiere al tratamiento de tumores óseos primarios y metastásicos, que incluyen tumores que se originan en la próstata, mama o pulmón y expresan factor de crecimiento similar al receptor de la insulina-I (IGF-IR) y/o el receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa (PDGFR α).

Los tumores a tratar pueden ser dependientes de hormona/andrógenos o independientes de hormona/andrógenos, y pueden haberse originado, por ejemplo, en la próstata, mama o pulmón.

La presente divulgación proporciona procedimientos para tratar un sujeto que tiene un tumor óseo, y procedimientos para inhibir el crecimiento de un tumor óseo. Los procedimientos comprenden administrar una cantidad eficaz de un antagonista de IGF-IR o una cantidad eficaz de un antagonista de PDGFR α . Los antagonistas de receptores incluyen anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, además de inhibidores de molécula pequeña intracelulares.

La presente divulgación proporciona anticuerpos anti-IGF-IR o anti-PDGFR α que se unen a su receptor diana e inhiben la unión a ligando. La divulgación también proporciona anticuerpos y otros antagonistas que neutralizan la activación de IGF-IR o PDGFR α . Adicionalmente, ciertos anticuerpos promueven la regulación por disminución de su receptor diana, por ejemplo, por internalización y/o degradación. Por consiguiente, los anticuerpos y antagonistas de molécula pequeña sirven para inhibir la activación de moléculas de señalización aguas abajo tales como Akt, p42/p44 y MAPK.

Los procedimientos incluyen el uso de antagonistas de IGF-IR o PDGFR α solos, en combinación entre sí o en combinación con otros agentes terapéuticos para el cáncer tales como agentes quimioterapéuticos y radiación.

La presente divulgación también proporciona anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen a PDGFR α , además de nucleótidos y célula huésped para la producción de los anticuerpos. Los anticuerpos bloquean la unión a ligando y neutralizan la activación del receptor. La divulgación también proporciona uso de los anticuerpos solos, en combinación con otros antagonistas de receptores o agentes antineoplásicos, o como conjugados para el tratamiento de enfermedad neoplásica. Los anticuerpos anti-PDGFR α se usan para tratar, por ejemplo, tumores de ovario, tumores de mama, tumores de pulmón, tumores hepatocelulares, tumores del estroma gastrointestinal, melanomas, carcinomas de células renales, tumores de próstata y sarcomas de tejido blando.

Según la presente invención, se proporciona un antagonista de PDGFR α para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer de huesos metastásico, en el que dicho antagonista de PDGFR α es un anticuerpo o fragmento del mismo que es específico para PDGFR α humano y que comprende SSSYY (SEC ID N°: 2) en CDRH1; SFFYTGSTYYNPSLRS (SEC ID N°: 4) en CDRH2; QSTYYYGSGNYGWFDR (SEC ID N°: 6) en CDRH3; RASQSVSSYLA (SEC ID N°: 10) en CDRL1; DASNRAT (SEC ID N°: 12) en CDRL2; y QQRSNWPPA (SEC ID N°: 14) en CDRL3.

Preferentemente, el antagonista de PDGFR α es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene

QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSINSSYYWGLRQSPGKGLEWIGSFFY
TGSTYYNPSLRSRLTISVDTSKNQFSLMLSSVTAADTAVYYCARQSTYYYGSGNY YGWFDRWDQGLVTVSS (SEC ID N°: 8) o un dominio variable de la cadena ligera que tiene
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT
GIPARFSGSGGTDFLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPPAFGQGTVEIK (SEC ID N°: 16).

Más preferentemente, el antagonista de PDGFR α es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene

QLQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSINSSSYWGWLRQSPGKGLEWIGSFFY
 TGSTYYNPSLRSLTISVDTSKNQFSLMLSSVTAADTAVYYCARQSTYYYYGSGNY
 YGWFDROWDQGLTVTVSS (SEC ID N°: 8) y un dominio variable de la cadena ligera que tiene
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT
 GIPARFSGSGGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSNWPPAFGQGTKVEIK (SEC
 ID N°: 16).

Preferentemente, el antagonista de PDGFR α es un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una cadena pesada que tiene

5 MGWSCILFLVATATGVHSQLQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSINSSSYWGW
 WLRQSPGKGLEWIGSFFYTGSTYYNPSLRSLTISVDTSKNQFSLMLSSVTAADT
 AVYYCARQSTYYYYGSGNYGWFDROWDQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
 GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHFFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
 SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPK
 10 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN
 VFSCVMHEALHNYHTQKSLSPGK (SEC ID N°: 31) y una cadena ligera que tiene

MGWSCILFLVATATGVHSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ
 QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSN
 WPPAFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW
 KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLS
 SPVTKSFNRGEC (SEC ID N°: 33).

15 Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un antagonista de PDGFR α para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene cáncer de huesos metastásico, en el que dicho antagonista de PDGFR α es un anticuerpo o fragmento del mismo que es específico para PDGFR α humano, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo compete para unirse a PDGFR α con un anticuerpo de la presente invención.

Preferentemente, el tumor se metastatiza de un cáncer de próstata, cáncer de mama o cáncer de pulmón.

20 El antagonista de PDGFR α de la presente invención es preferentemente uno que inhibe la unión de PDGFR α o neutraliza PDGFR α .

Descripción de las figuras

25 La Figura 1 representa crecimiento de tumores de xenoinjerto subcutáneos de LuCaP 35V en ratones SCID castrados durante un periodo de tratamiento iniciado cuando los tumores habían alcanzado 150-200 mm³. Panel A: controles sin tratar; Panel B: los animales se trataron durante cuatro semanas con docetaxel (tanto 10 mg/kg como 20 mg/kg) solo, o en combinación con anticuerpos anti-IGF-IR (40 mg/kg de IMC-A12); Panel C: niveles de PSA en suero en ratones SCID tratados y sin tratar que portan tumores de xenoinjerto de LuCaP 35V subcutáneos. Los ratones tratados recibieron docetaxel (20 mg/kg) solo o docetaxel (tanto 10 mg/kg como 20 mg/kg) en combinación con anticuerpos anti-IGF-IR (40 mg/kg de IMC-A12). El tratamiento se inició cuando los tumores habían alcanzado 150-200 mm³ y terminaron después de cuatro semanas.

30 La Figura 2 muestra suspensiones de células individuales de tumores de xenoinjerto de LuCaP 35V tratados con docetaxel (10 mg/kg) solo (Panel A) o en combinación con anticuerpos anti-IGF-IR (40 mg/kg de IMC-A12) (Panel B). El campo marcado R1 se corresponde con células apoptóticas con ADN fragmentado (marcado de FITC elevado).

35 La Figura 3 muestra síntesis de ADN (captación de BrDu) en xenoinjertos de tumor tras la terminación de tratamiento con docetaxel (10 mg/kg o 20 mg/kg) solo, y en combinación con anticuerpos anti-IGF-IR (40 mg/kg de IMC-A12).

La Figura 4 representa la expresión diferencial de genes asociados a agresividad del tumor de próstata (TUBB), resistencia a terapia antiandrogénica (BIRC 5) e inducción de apoptosis (IGFBP3) en células tumorales de próstata en respuesta a tratamiento con docetaxel y A12 y docetaxel solo.

La Figura 5 muestra niveles en suero de A12 tras el cese del tratamiento.

La Figura 6 muestra el peso corporal (una medida de citotoxicidad global) de animales no enfermos tratados continuamente con docetaxel (tanto 10 mg/kg como 20 mg/kg) solo, o en combinación con anticuerpos anti-IGF-IR (40 mg/kg de IMC-A12).

5 La Figura 7 muestra el efecto del tratamiento con un anticuerpo anti-IGF-IR (IMC-A12) en PSA producido por xenoinjerto en ratones SCID injertados con células LuCaP 23.1.

La Figura 8 muestra una serie de fotografías de rayos X de ratones SCID injertados con células LuCaP 23.1. Ratones A12 recibieron 40 mg/ml de IMC-A12 i.p. tres veces a la semana durante seis semanas. Las fotografías de rayos X se hicieron en el momento del sacrificio.

10 La Figura 9 muestra niveles de PSA (a) y radiografías representativas (b) de ratones SCID con xenoinjertos intratibiales de células de próstata humana LuCaP 23.1.

La Figura 10 representa el efecto de aspirado de médula ósea sobre la actividad de Akt en células de cáncer de próstata. Lisados celulares se sometieron a SDS-PAGE. Para el análisis de transferencia Western, las membranas se transfirieron con anticuerpos que eligen fosfo-Akt como diana (Ser-473, Cell Signaling Technology), PDGFR α (R&D Systems) y actina (Sigma). La unión del anticuerpo primario se detectó usando proteína A conjugada con HRP o proteína G (Sigma).

15

La Figura 11 representa la inducción e inhibición de la fosforilación de AKT en células PC3-ML. El panel A muestra la inhibición dependiente de dosis de AG-1296 de la fosforilación de Akt en células expuestas a 30 ng/ml de PDFG-BB. El panel B muestra la fosforilación de Akt de aspirado de hueso e inhibición por AG-1296 20 μ M. El panel C muestra la potencia de aspirado de médula ósea para inducir fosforilación de Akt con respecto a la potencia de una combinación de 100 pg/ml de PDGF-AA y 100 pg/ml de PDGF-BB. El panel D compara las magnitudes de fosforilación de Akt inducida por aspirado de médula ósea, fosforilación de Akt inducida por inhibición de médula ósea por AG-1296 y fosforilación de Akt inducida por PDFG-AA + PDFG-BB.

20

La Figura 12 representa la inhibición de la fosforilación de Akt en células PC3-ML por antagonistas de PDGFR α . El panel A muestra el efecto dependiente de la dosis del anticuerpo monoclonal IMC-3G3 sobre la fosforilación de Akt inducida por 30 ng/ml de PDGF-BB. Los paneles B y C proporcionan una comparación de los efectos de IMC-3G3 y AG1296 sobre la fosforilación de Akt inducida por médula ósea. El panel D muestra que la inhibición de la fosforilación de Akt depende del tiempo de preincubación de IMC-3G3.

25

Las Figuras 13 muestran la unión de anticuerpo a PDGFR α . A: unión directa de anticuerpo anti-PDGFR α al dominio extracelular inmovilizado de PDGFR α B: inhibición de la unión de [¹²⁵I]PDGF-AA a PDGFR α inmovilizado.

30

La Figura 14 muestra la inhibición específica de fosforilación de PDGFR α y moléculas efectoras aguas abajo.

La Figura 15 muestra la inhibición de la incorporación de [³H]timidina estimulada por PDGF-AA en células PAE R α por mAb.

35 La Figura 16 muestra la inhibición de la activación de moléculas efectoras aguas abajo inducida por PDGF-AA en células SKLMS-1 (A) y U118 (B).

La Figura 17 muestra la inhibición de la incorporación de [³H]timidina estimulada por PDGF-AA en células U118 (A) y SKLMS-1 (B) por mAb. La inhibición de la incorporación de [³H]timidina estimulada por PDGF-BB también se muestra para células SKLMS-1 (C) y U118 (D).

40 La Figura 18 muestra los efectos dependientes de la dosis para el tratamiento de xenoinjertos de tumor U118 (glioblastoma; panel A) y SKLMS-1 (leiomiocarcinoma; panel B) establecidos en ratones sin pelo.

La Figura 19 muestra la reducción de la fosforilación de PDGFR α *in vivo* en tumores U118 tratados con anticuerpo anti-PDGFR α , con respecto al tratamiento con IgG humana no específica.

45 La Figura 20 representa los vectores de expresión GS usados para clonar genes de las regiones variables VH y Vk humanas derivadas de hibridoma y la expresión de proteínas de las cadenas pesada (IgG1) y ligera completas humanas. Los dos vectores se recombinaron como se explica en los ejemplos y el vector combinado se transfirió en células NS0.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación se refiere al tratamiento de tumores óseos con anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que

se unen al factor de crecimiento similar al receptor de la insulina-I (IGF-IR). La expresión endocrina de IGF-I está regulada principalmente por la hormona de crecimiento y se produce en el hígado, pero otros tipos de tejido también pueden expresar IGF-I, que incluye hueso que contiene un gran almacén de factores de crecimiento. Dependiendo del tipo de célula tumoral, IGF-I participa en la regulación endocrina, paracrina y/o autocrina (Yu, H. y Rohan, J., J. Natl. Cancer Inst. 92:1472-89 (2000)).

Se ha descubierto que los anticuerpos que se unen a IGF-IR son útiles en terapias para el tratamiento de tumores óseos que expresan IGF-IR. Los anticuerpos pueden usarse solos o en combinación con otros agentes terapéuticos para el cáncer, particularmente quimioterapéuticos. La terapia anti-IGF-IR, sola o en combinación con terapia con uno o más agentes antineoplásicos (tales como, por ejemplo, quimioterapia o radioterapia), tiene significativa eficacia terapéutica. La supresión del crecimiento tumoral va frecuentemente acompañada de un aumento en la apoptosis y persiste después de suspenderse el tratamiento y los tumores han empezado de nuevo a crecer en animales tratados con quimioterapia solo.

También se ha descubierto que PDGFR α desempeña una función importante en el crecimiento de tumores óseos. Por ejemplo, ciertas líneas celulares tumorales que expresan PDGFR α metastatizan preferencialmente al hueso. Tales líneas celulares muestran elevada activación de PDGFR α y fosforilación de moléculas de señalización aguas abajo en respuesta a factores solubles presentes en la médula ósea. La activación de PDGFR α por la médula ósea se reduce o inhibe completamente por antagonistas de PDGFR α , y se reduce enormemente la fosforilación de moléculas de señalización aguas abajo que son comúnmente activadas por la señalización mediante PDGFR α y otros sistemas de tirosina cinasas de receptor. Ciertos datos sugieren que la ruta de supervivencia de PI3K/Akt se activa por señalización de PDGFR α no solo por ligandos que activan PDGFR α directamente, sino también por factores presentes en la médula ósea que producen la transactivación del receptor.

Los tumores óseos primarios que van a tratarse según la invención incluyen, pero no se limitan a, osteosarcomas, condrosarcomas, fibrosarcomas y hemangiosarcomas. En particular, los tumores secundarios malignos (metastásicos) son mucho más comunes que los tumores óseos primarios. Los tumores óseos metastásicos que van a tratarse según la invención pueden producirse de una variedad de fuentes, las más comunes de las cuales son cánceres de la próstata, mama o pulmón. La fuente de un cáncer de huesos metastásico será normalmente evidente de la historia de un paciente. Los tumores pueden ser osteoblásticos u osteolíticos. Los tumores pueden ser dependientes de la estimulación de IGF-IR cuando aparecen, o pueden tener una transición a dependencia de IGF-IR. Por ejemplo, los cánceres de próstata o metástasis de cánceres de próstata que son inicialmente dependientes de hormona/andrógenos y controlables por tratamientos físicos o químicos que suprimen la producción de andrógenos o de hormonas pueden convertirse en independientes de hormona/andrógenos mediante la elevada sensibilidad a estimulación mediante IGF-IR. Además, además de proporcionar tratamiento de tumores independientes de hormonas/andrógenos, la invención puede ser útil para tratar tumores óseos dependientes de hormonas/andrógenos sin dependencia en la supresión de la producción de andrógenos u hormonas, por ejemplo, coadministrando anticuerpos para IGF-IR con agentes antineoplásicos. Tales tumores incluirían tumores óseos metastásicos que se estimulan mediante IGF-IR en el entorno rico en IGF del hueso, que puede ser sensible a estimulación hormonal pero no sensible a crecer sin participación de IGF. La ablación hormonal podría no ser necesaria para tales tumores.

También pueden tratarse tumores óseos que son dependientes de PDGF, además de tumores que son dependientes de la "médula ósea". Los tumores dependientes de la médula ósea muestran activación de PDGFR α en respuesta a factores solubles presentes en la médula ósea. Por ejemplo, como se ejemplifica en el presente documento, una línea de células cancerosas que expresa PDGFR α metastásico humano experimenta activación de PDGFR α y fosforilación de Akt+ tras la exposición a aspirado de médula ósea. Un anticuerpo anti-PDGFR α y un antagonista de PDGFR α de molécula pequeña inhiben cada uno la activación de PDGFR α y fosforilación de Akt+ en la línea celular. Los factores de la médula ósea solubles que activan PDGFR α incluyen, pero no se limitan a, PDGF-AA y -BB.

Aunque tal dependencia de la médula ósea implica señalización mediante PDGFR α , puede no implicar solo la unión de PDGFR α de un ligando de PDGFR α . Por ejemplo, como se ejemplifica en el presente documento, se observa que la activación de PDGFR α por ligandos definidos (PDGF-AA o -BB) es más débil que la activación por aspirado de médula ósea. Además, se observa que en presencia de aspirado de médula ósea, la fosforilación de Akt+ disminuye al aumentar el tiempo de incubación. Tomados conjuntamente, estos resultados sugieren que además de responder a la unión de PDGF, PDGFR α puede transactivarse (fosforilarse) por otros elementos de transducción de señales (por ejemplo, otras tirosina cinasas de receptor) sensibles a otros componentes de la médula ósea. En cualquier caso, en una línea celular apta para crecimiento metastásico en hueso (es decir, una línea celular que metastatiza preferencialmente al hueso), se observa activación de PDGFR α dependiente de médula ósea, que se inhibe por antagonistas de PDGFR α . Además, el tratamiento con un antagonista de PDGFR α inhibe la estimulación inducida por médula ósea de la ruta antiapoptótica PI3K/Akt y proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK).

Los tumores óseos que van a tratarse con un antagonista de PDGFR α pueden producirse como metástasis de células de cáncer de próstata, y, como antes, pueden ser dependientes de hormonas/andrógenos, o haber tenido una

transición a independencia de hormonas/andrógenos. Tales tumores también pueden producirse como metástasis de cánceres de no próstata. Un experto en la materia podría diagnosticar fácilmente tales afecciones y trastornos usando pruebas convencionales conocidas.

5 Tratamiento significa cualquier tratamiento de una enfermedad en un animal e incluye: (1) prevenir que se produzca la enfermedad en un mamífero que puede estar predispuesto a la enfermedad, pero que todavía no experimenta o muestra síntomas de la enfermedad; por ejemplo, prevención del estallido de los síntomas clínicos; (2) inhibir la enfermedad, por ejemplo, detener su desarrollo; o (3) aliviar la enfermedad, por ejemplo, causar la regresión de los síntomas de la enfermedad. Inhibir el crecimiento tumoral incluye ralentizar o detener el crecimiento, además de causar la regresión del tumor. Una cantidad eficaz para el tratamiento de una enfermedad significa la cantidad que, cuando se administra a un mamífero en necesidad del mismo, es suficiente para efectuar el tratamiento, como se ha definido anteriormente, para esa enfermedad. Antagonistas de IGF-IR y el antagonista de PDGFR α pueden administrarse solos, en combinación con otros, o en combinación con uno o más agentes antineoplásicos tales como, por ejemplo, un agente quimioterapéutico o radiológico.

10 Puede desearse determinar el nivel de expresión de IGF-IR y/o PDGFR α en un tumor que va a tratarse. En tales casos, pueden recogerse biopsias de tumor y analizarse mediante procedimientos muy conocidos en la técnica. Un antagonista de IGF-IR o antagonista de PDGFR α se administra basándose en que el receptor correspondiente se expresa comúnmente o activa en un tipo de tumor particular o se expresa invariablemente o activa a medida que progresa la enfermedad.

15 Un antagonista de IGF-IR puede ser un antagonista extracelular o un antagonista intracelular y puede emplearse más de un antagonista. Antagonistas extracelulares incluyen, pero no se limitan a, proteínas u otras moléculas biológicas que se unen a IGF-IR o uno o más de sus ligandos (por ejemplo, IGF-I y IGF-II son ligandos naturales de IGF-IR). Un antagonista extracelular inhibe la unión de IGF-IR a sus ligandos. El antagonista es un anticuerpo anti-IGF-IR tal como, por ejemplo, IMC-A12. El antagonista es un fragmento de unión a ligando soluble de IGF-IR. Los antagonistas de IGF-IR intracelulares pueden ser moléculas biológicas, pero son normalmente moléculas pequeñas. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, inhibidor de tirosina cinasas AG1024 (Calbiochem), inhibidor de cinasas del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina I NVP-AEW541 (Novartis) e inhibidor del receptor de factor de crecimiento similar a la insulina-I/insulina BMS-554417 (Bristol Myers Squibb). Se apreciará que la molécula pequeña útil que va a usarse en la invención son inhibidores de IGF-IR, pero no necesitan ser completamente específicos para IGF-IR.

20 Los anticuerpos anti-IGF-IR que van a usarse según la presente divulgación presentan una o más de las siguientes propiedades:

30 1) Los anticuerpos se unen al dominio eterno de IGF-IR e inhiben la unión de IGF-I o IGF-II a IGF-IR. La inhibición puede determinarse, por ejemplo, por un ensayo de unión directo usando receptor purificado o unido a membrana. En esta realización, los anticuerpos o fragmentos de los mismos se unen preferentemente a IGF-IR al menos tan fuertemente como los ligandos naturales de IGF-IR (IGF-I y IGF-II).

35 2) Los anticuerpos neutralizan IGF-IR. La unión de un ligando, por ejemplo, IGF-I o IGF-II, a un dominio extracelular externo de IGF-IR estimula la autofosforilación de la subunidad beta y moléculas de señalización aguas abajo, que incluyen MAPK, Akt y IRS-1.

40 La neutralización de IGF-IR incluye inhibición, disminución, inactivación y/o alteración de una o más de estas actividades normalmente asociadas a la transducción de señales. La neutralización puede determinarse *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* usando, por ejemplo, tejidos, célula cultivada o componentes celulares purificados. La neutralización incluye inhibición de heterodímeros de IGF-IR / IR, además de homodímeros de IGF-IR. Así, el neutralizar IGF-IR tiene diversos efectos, que incluyen inhibición, disminución, inactivación y/o alteración del crecimiento (proliferación y diferenciación), angiogénesis (reclutamiento de vasos sanguíneos, invasión y metástasis) y motilidad y metástasis celular (adhesión e invasividad celular).

45 Una medida de la neutralización de IGF-IR es la inhibición de la actividad de tirosina cinasas del receptor. La inhibición de tirosina cinasas puede determinarse usando procedimientos muy conocidos; por ejemplo, midiendo el nivel de autofosforilación del receptor de cinasas recombinante, y/o fosforilación de sustratos naturales o sintéticos. Así, los ensayos de fosforilación son útiles en determinar anticuerpos neutralizantes en el contexto de la presente invención. La fosforilación puede detectarse, por ejemplo, usando un anticuerpo específico para fosfotirosina en un ensayo de ELISA o en una transferencia Western. Algunos ensayos para actividad de tirosina cinasas se describen en Panek y col., J. Pharmacol. Exp. Thera. 283: 1433-44 (1997) y Batley y col., Life Sci. 62:143-50 (1998). Los anticuerpos de la invención producen una disminución en la fosforilación de tirosina de IGF-IR de al menos aproximadamente el 75 %, preferentemente al menos aproximadamente el 85 %, y más preferentemente al menos aproximadamente el 90 % en células que responden a ligando.

55 Otra medida de neutralización de IGF-IR es la inhibición de la fosforilación de sustratos aguas abajo de IGF-IR. Por

consiguiente, el nivel de fosforilación de MAPK, Akt o IRS-1 puede medirse. La disminución en la fosforilación es de al menos aproximadamente el 40 %, y puede ser de al menos aproximadamente el 60 %, o de al menos aproximadamente el 80 %.

5 Además, pueden utilizarse procedimientos para la detección de la expresión de proteínas para determinar la neutralización de IGF-IR, en los que las proteínas que se miden están reguladas por la actividad de tirosina cinasas de IGF-IR. Estos procedimientos incluyen inmunohistoquímica (IHC) para la detección de la expresión de proteínas, hibridación por fluorescencia *in situ* (FISH) para la detección de la amplificación génica, ensayos de unión a radioligando competitivos, técnicas de transferencia en matriz sólida tales como transferencias Northern y Southern, reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa inversa (RT-PCR) y ELISA. Véanse, por ejemplo, Grandis y col.,
10 Cancer, 78:1284-92 (1996); Shimizu y col., Japan J. Cancer Res., 85:567-71 (1994); Sauter y col., Am. J. Path., 148:1047-53 (1996); Collins, Glia 15:289-96 (1995); Radinsky y col., Clin. Cancer Res. 1:19-31 (1995); Petrides y col., Cancer Res. 50:3934-39 (1990); Hoffmann y col., Anticancer Res. 17:4419-26 (1997); Wikstrand y col., Cancer Res. 55:3140-48 (1995).

15 También pueden utilizarse ensayos *ex vivo* para determinar la neutralización de IGF-IR. Por ejemplo, puede observarse la inhibición de tirosina cinasas del receptor por ensayos mitogénicos usando líneas celulares estimuladas con ligando de receptor en presencia y ausencia de inhibidor. La línea de cáncer de mama MCF7 (Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Rockville, MD) es una línea celular tal que expresa IGF-IR y se estimula por IGF-I o IGF-II. Otro procedimiento implica probar la inhibición del crecimiento de células tumorales que expresan IGF-IR o células transfectadas para expresar IGF-IR. La inhibición también puede observarse usando modelos de tumor, por ejemplo,
20 células tumorales humanas inyectadas en un ratón.

Los anticuerpos no están limitados por ningún mecanismo particular de neutralización de IGF-IR. Los anticuerpos anti-IGF-IR pueden unirse externamente al receptor de la superficie celular de IGF-IR, bloquear la unión de ligando (por ejemplo, IGF-I o IGF-II) y posterior transducción de señales mediada por tirosina cinasa asociada al receptor, y prevenir la fosforilación del IGF-IR y otras proteínas aguas abajo en la cascada de transducción de señales.

25 3) Los anticuerpos modulan por disminución IGF-IR. La cantidad de IGF-IR presente sobre la superficie de una célula depende de la producción, internalización y degradación de proteína del receptor. La cantidad de IGF-IR presente sobre la superficie de una célula puede medirse indirectamente, detectando la internalización del receptor o una molécula unida al receptor. Por ejemplo, la internalización del receptor puede medirse poniendo en contacto células que expresan IGF-IR con un anticuerpo marcado. Entonces, el anticuerpo unido a membrana se desprende, se recoge
30 y se cuenta. El anticuerpo internalizado se determina lisando las células y detectando marca en los lisados.

Otro forma es medir directamente la cantidad del receptor presente sobre la célula tras el tratamiento con un anticuerpo anti-IGF-IR u otra sustancia, por ejemplo, por análisis de citometría de flujo activada por fluorescencia de células teñidas para la expresión superficial de IGF-IR. Las células teñidas se incuban a 37 °C y la intensidad de fluorescencia se mide con el tiempo. Como control, parte de la población teñida puede incubarse a 4 °C (condiciones bajo las que se
35 detiene la internalización del receptor).

El IGF-IR de la superficie celular puede detectarse y medirse usando un anticuerpo diferente que es específico para IGF-IR y que no bloquea o compite con la unión del anticuerpo que se prueba (Burtrum, y col. Cancer Res. 63:8912-21 (2003)). El tratamiento de una célula que expresa IGF-IR con un anticuerpo produce reducción de IGF-IR de la superficie celular. En una realización preferida, la reducción es de al menos aproximadamente el 70 %, más
40 preferentemente de al menos aproximadamente el 80 %, e incluso más preferentemente de al menos aproximadamente el 90 % en respuesta a tratamiento con un anticuerpo. Puede observarse una disminución significativa en tan solo cuatro horas.

Otra medida de modulación por disminución es la reducción de la proteína de receptor total presente en una célula, y refleja la degradación de receptores internos. Por consiguiente, el tratamiento de células (particularmente células cancerosas) con anticuerpos produce una reducción en IGF-IR celular total. En un aspecto preferido, la reducción es de
45 al menos aproximadamente el 70 %, más preferentemente de al menos aproximadamente el 80 %, e incluso más preferentemente de al menos aproximadamente el 90 %.

Para el tratamiento de sujetos humanos, los anticuerpos son preferentemente humanos. Alternativamente, los anticuerpos pueden ser de primates no humanos u otros mamíferos, o ser anticuerpos humanizados o quiméricos. Un anticuerpo anti-IGF-IR comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco y/o seis regiones determinantes de la
50 complementariedad (CDR) seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID N°: 35, SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 45, SEC ID N°: 47 y SEC ID N°: 49 (CDR1H, CDR2H, CDR3H, CDR1L, CDR2L, CDR3L, respectivamente). El anticuerpo anti-IGF-IR comprende una, dos, tres, cuatro, cinco y/o seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID N°: 35, SEC ID N°: 37, SEC ID N°: 39, SEC ID N°: 55, SEC ID N°: 57 y SEC ID N°: 59 (CDR1H, CDR2H, CDR3H, CDR1L, CDR2L, CDR3L, respectivamente).
55 Preferentemente, los anticuerpos (o fragmentos de los mismos) tienen CDR de la cadena pesada de SEC ID N°: 35,

SEC ID N°: 37 y SEC ID N°: 39. Alternativamente y también preferentemente, los presentes anticuerpos que incluyen fragmentos de los mismos tienen CDR de la cadena ligera de SEC ID N°: 45, SEC ID N°: 47 y SEC ID N°: 49 o SEC ID N°: 55, SEC ID N°: 57 y SEC ID N°: 59. Un anticuerpo anti-IGF-IR tal es el anticuerpo para IgG1 humano IMC-A12 (documento WO2005016970), que tiene un dominio variable de la cadena pesada representado por SEC ID N°: 41 y un dominio variable de la cadena ligera representado por SEC ID N°: 51. Otro anticuerpo humano preferido es IMC-2F8 (documento WO2005016970), que tiene un dominio variable de la cadena pesada idéntico a IMC-A12 y un dominio variable de la cadena ligera representado por SEC ID N°: 61. Anticuerpos útiles incluyen adicionalmente anticuerpos anti-IGF-IR que compiten con IMC-A12 o IMC-2F8 para unirse a IGF-IR, además de anticuerpos que se unen a otros epítopes (es decir, anticuerpos que se unen a otros epítopes y presentan propiedades como se han descrito previamente tales como bloqueo de ligandos, internalización de receptor, etc., pero no compiten con IMC-A12 o IMC-2F8).

También pueden usarse antagonistas de PDGFR α para el tratamiento. Un antagonista de PDGFR α puede ser un antagonista extracelular o un antagonista intracelular y puede emplearse más de un antagonista. Antagonistas extracelulares incluyen, pero no se limitan a, proteínas u otras moléculas biológicas que se unen a PDGFR α o uno o más de sus ligandos (por ejemplo, PDGF-AA, -AB, -BB, -CC). Un antagonista extracelular inhibe la unión de PDGFR α a sus ligandos. En un aspecto, el antagonista es un anticuerpo anti-PDGFR α tal como, por ejemplo, IMC-3G3. En otro aspecto, la proteína de unión es un fragmento de unión a ligando soluble de PDGFR α . Los antagonistas de IGF-IR intracelulares pueden ser moléculas biológicas, pero normalmente son moléculas pequeñas. En un aspecto, el antagonista de PDGFR α intracelular es AG1296. AG1296 (Calbiochem) es un inhibidor de PDGF α , PDGF β y c-KIT, y también reacciona con Flt3. Otras moléculas pequeñas que eligen PDGFR como diana incluyen STI-571 (mesilato de imatinib, Gleevec®, Novartis) y SU11248 (maleato de sunitinib, SUTENT®, Pfizer).

Un anticuerpo anti-PDGFR α comprende una, dos, tres, cuatro, cinco y/o seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 12 y SEC ID N°: 14 (CDR1H, CDR2H, CDR3H, CDR1L, CDR2L, CDR3L, respectivamente). Preferentemente, los anticuerpos (o fragmentos de los mismos) tienen CDR de SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 4 y SEC ID N°: 6. Alternativamente y también preferentemente, los presentes anticuerpos, o fragmentos de los mismos, tienen CDR de SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 12 y SEC ID N°: 14. Las secuencias de aminoácidos de las CDR se exponen a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1 - CDR de IMC-3G3

<u>Cadena pesada</u>		
CDR1	SSSY	SEC ID N°: 2
CDR2	SFFYTGSTYINPSLRS	SEC ID N°: 4
CDR3	QSTYYYGSGNYYGWFD	SEC ID N°: 6
<u>Cadena ligera</u>		
CDR1	RASQSVSSYLA	SEC ID N°: 10
CDR2	DASNRAT	SEC ID N°: 12
CDR3	QQRSNWPPA	SEC ID N°: 14

En otro aspecto, el anticuerpo anti-PDGFR α , o fragmento del mismo, tiene una región variable de la cadena pesada humana de SEC ID N°: 8 y/o una región variable de la cadena ligera humana de SEC ID N°: 16. IMC-3G3 es un anticuerpo tal y se ejemplifica en la presente divulgación.

Preferentemente, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, neutralizan PDGFR α . La unión de un ligando, por ejemplo, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB o PDGF-CC, a un dominio extracelular de PDGFR α estimula la dimerización de receptores, autofosforilación, activación del dominio de tirosina cinasa citoplásmico interno del receptor e iniciación de múltiples rutas de transducción de señales y transactivación que participan en la regulación de la síntesis de ADN (activación de genes) y progresión o división del ciclo celular. Los anticuerpos anti-PDGFR α normalmente bloquean la unión a ligando y/o dimerización de receptores, e inhiben una o más de la autofosforilación, activación de actividad de tirosina cinasas y transducción de señales. Los anticuerpos anti-PDGFR α pueden ser específicos para la región de unión a ligando extracelular de PDGFR α y previenen la unión de un ligando de PDGFR α . Preferentemente, tales anticuerpos anti-PDGFR α , o fragmentos de los mismos, se unen a PDGFR α al menos tan fuertemente como los ligandos naturales de PDGFR α . Alternativamente o adicionalmente, los anticuerpos pueden ser específicos para una

región del monómero de receptor que de otro modo formaría una superficie de separación del dímero de receptores. Tales anticuerpos bloquean la formación de dímeros, aunque la unión de ligando a un monómero de receptor podría o no podría bloquearse.

Como se ha descrito anteriormente para anticuerpos anti-IGF-IR, la neutralización de receptores puede determinarse mediante una variedad de procedimientos *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. Los anticuerpos anti-PDGFR α reducen la fosforilación de PDGFR α al menos aproximadamente el 75 %. En otros aspectos, la fosforilación se reduce por al menos aproximadamente el 85 % o al menos aproximadamente el 90 %. Como resultado de la inhibición de la transducción de señales de PDGFR α , la fosforilación de un componente de la ruta de transducción de señales aguas abajo (por ejemplo, Akt, p42/p44, etc.) se reduce al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 60 % o al menos aproximadamente el 80 %. La neutralización de receptores puede determinarse usando ligandos definidos (por ejemplo, PDGF-AA,-AB, -BB, -CC), mezclas de tales ligandos o preparaciones tales como aspirados de médula ósea que comprenden PDGF, además de otros factores de crecimiento estimulantes.

La neutralización de PDGFR α incluye inhibición, disminución, inactivación y/o alteración de una o más de estas actividades normalmente asociadas a la transducción de señales. Así, el neutralizar PDGFR α tiene diversos efectos, que incluyen inhibición, disminución, inactivación y/o alteración del crecimiento (proliferación y diferenciación), angiogénesis (reclutamiento de vasos sanguíneos, invasión y metástasis) y motilidad y metástasis celular (adhesión e invasividad celular).

También pueden utilizarse ensayos *ex vivo*, como se ha descrito anteriormente, para determinar la neutralización de PDGFR α . Por ejemplo, pueden usarse células de leiomioma SKLMS-1 humanas (Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Rockville, MD; ATCC HTB-88™) o células de glioblastoma U118 (ATCC HTB-15™) estimuladas con PDGF-AA para ensayar la inhibición de PDGFR α . La inhibición del crecimiento puede determinarse usando células tumorales humanas que expresan PDGFR α inyectadas en un ratón SCID.

La presente divulgación no está limitada por ningún mecanismo particular de neutralización de PDGFR α . Los anticuerpos anti-PDGFR α se unen externamente al receptor de la superficie celular de PDGFR α , bloquean la unión de ligando (por ejemplo, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC), inhiben la fosforilación de PDGFR α , inhiben la transducción de señales mediada por la tirosina cinasa asociada a receptor y modulan la actividad de componentes de la transducción de señales aguas abajo. El complejo receptor-anticuerpo también puede internalizarse y degradarse, produciendo la regulación por disminución de receptores de la superficie celular. Las metaloproteinasas de matriz, que funcionan en la invasión y metástasis de células tumorales, también pueden regularse por disminución por los anticuerpos. Además, los anticuerpos pueden presentar inhibición de la producción y angiogénesis de factores de crecimiento.

Como se ha descrito anteriormente, los antagonistas de PDGFR α son útiles para tratar tumores óseos, que incluyen tumores óseos metastásicos. Otros tipos de tumores que expresan PDGFR α y pueden tratarse incluyen, pero no se limitan a, tumores de ovario, tumores de mama, tumores de pulmón, tumores hepatocelulares, tumores del estroma gastrointestinal, melanoma, carcinoma de células renales, tumores de próstata y sarcomas de tejido blando. Los sarcomas de tejido blando se originan en tejidos tales como grasa, músculos, nervios, tendones y vasos sanguíneos y linfáticos. Normalmente, las células tumorales expresan en exceso PDGFR α . La expresión de PDGFR α puede determinarse, por ejemplo, por histoquímica o análisis de ARN. Por ejemplo, un análisis de Scatchard de unión de IMC-3G3 radiomarcado a células U118 y células tumorales SKLMS-1 indica que el número de moléculas de PDGFR α sobre las células es aproximadamente 500 y 2500, respectivamente.

Los antagonistas de PDGFR α funcionan inhibiendo la transducción de señales por PDGFR α expresada sobre las propias células tumorales, o inhibiendo PDGFR α expresado sobre células del estroma circundantes que de otro modo experimentan estimulación paracrina por PDGF expresados de células tumorales. Así, anticuerpos tales como IMC-3G3 y otros antagonistas de PDGFR α son útiles para tratar tumores caracterizados por estimulación autocrina y/o paracrina de PDGFR α .

Pueden producirse fragmentos de anticuerpos escindiendo un anticuerpo completo, o expresando ADN que codifica el fragmento. Los fragmentos de anticuerpos pueden prepararse mediante procedimientos descritos por Lamoyi y col., J. Immunol. Methods, 56: 235-243 (1983) y por Parham, J. Immunol. 131: 2895-2902 (1983). Tales fragmentos pueden contener uno o ambos fragmentos Fab o el fragmento F(ab')₂. Tales fragmentos también pueden contener anticuerpos de la región variable de fragmentos monocatenarios, es decir, scFv, dicuerpos u otros fragmentos de anticuerpos. Procedimientos de producción de tales equivalentes funcionales se desvelan en la solicitud PCT WO 93/21319, solicitud de patente europea nº EP 239400; solicitud PCT WO 89/09622; solicitud de patente europea EP 338745; y solicitud de patente europea EP 332424.

Células huésped preferidas para la transformación de vectores y expresión de los anticuerpos de la presente invención son células de mamífero, por ejemplo, células COS-7, células de ovario de hámster chino (CHO) y líneas celulares de origen linfoide tales como células de linfoma, mieloma (por ejemplo, NS0) o hibridoma. Alternativamente pueden usarse

otros huéspedes eucariotas tales como levaduras.

Si se desea expresar una construcción de gen en levadura, un gen de selección adecuado para su uso en levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7. Stinchcomb y col. *Nature*, 282: 39 (1979); Kingsman y col., *Gene*, 7: 141 (1979). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC nº 44076 o PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85: 12 (1977). La presencia de daño de *trp1* en el genoma de la célula huésped de levadura proporciona entonces un entorno eficaz para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano. Similarmente, cepas de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC 20.622 ó 38.626) se complementan por plásmidos conocidos que llevan el gen *Leu2*.

Las células huésped transformadas se cultivan mediante procedimientos conocidos en la técnica en un medio líquido que contiene fuentes asimilables de carbono (hidratos de carbono tales como glucosa o lactosa), nitrógeno (aminoácidos, péptidos, proteínas o sus productos de degradación tales como peptonas, sales de amonio o similares) y sales inorgánicas (sulfatos, fosfatos y/o carbonatos de sodio, potasio, magnesio y calcio). El medio contiene además, por ejemplo, sustancias promotoras del crecimiento tales como oligoelementos, por ejemplo, hierro, cinc, manganeso y similares.

Anticuerpos anti-PDGFR α y anti-IGF-IR de alta afinidad según la presente invención pueden aislarse de una biblioteca de expresión en fago construida a partir de genes de la región variable de la cadena pesada y cadena ligera humana. Por ejemplo, un dominio variable de la invención puede obtenerse a partir de un linfocito de sangre periférica que contiene un gen de la región variable reorganizado. Alternativamente, pueden obtenerse porciones de dominio variable, tales como regiones CDR y FW, a partir de diferentes fuentes y recombinarse. Además, porciones de los dominios variables (por ejemplo, regiones FW) pueden ser secuencias consenso sintéticas.

Pueden obtenerse anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, a partir de anticuerpos que se producen naturalmente, o bibliotecas de Fab o scFv de expresión en fago. Se entiende que, para preparar un anticuerpo de un único dominio a partir de un anticuerpo que comprende un dominio V_H y V_L, pueden desearse ciertas sustituciones de aminoácidos fuera de las CDR para potenciar la unión, expresión o solubilidad. Por ejemplo, puede desearse modificar residuos de aminoácidos que de otro modo estarían enterrados en la superficie de separación de V_H-V_L.

Además, pueden obtenerse anticuerpos y fragmentos de anticuerpos por tecnología de hibridomas convencional (Harlow & Lane, ed., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, 211-213 (1998),) usando ratones transgénicos (por ejemplo, ratones KM de Medarex, San Jose, Calif.) que producen cadenas pesadas gamma y ligeras kappa humanas de inmunoglobulina. En un aspecto preferido, una porción sustancial del genoma productor de anticuerpo humano se inserta en el genoma del ratón y se convierte en deficiente en la producción de anticuerpos murinos endógenos. Tales ratones puede inmunizarse subcutáneamente (s.c.) con PDGFR α (normalmente en adyuvante completo de Freund) con refuerzos según se necesite. Los procedimientos de inmunización son muy conocidos en la técnica.

La proteína usada para identificar anticuerpos de unión para IGF-IR es preferentemente IGF-IR y, más preferentemente, es el dominio extracelular de IGF-IR. La proteína usada para identificar anticuerpos de unión para PDGFR α es preferentemente PDGFR α y, más preferentemente, es el dominio extracelular de PDGFR α . Tales dominios extracelulares pueden estar libres o conjugarse con otras moléculas.

La presente divulgación también proporciona polinucleótidos aislados que codifican los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, descritos previamente. Detalles del anticuerpo anti-IGF-IR IMC-A12 se desvelan en el documento WO2005016970. La Tabla 2 expone las secuencias de ácidos nucleicos para IMC-3G3.

Tabla 2 - Secuencias de nucleótidos que codifican CDR de IMC-3G3

<u>Cadena pesada</u>		
CDR1	agtagtagtt actac	SEC ID Nº: 1
CDR2	agtttctttt atactgggag cacctactac aaccggtccc tcaggagt	SEC ID Nº: 3
CDR3	cagtccacgt attactatgg ttcggggaat tattatggct gggtcgaccg c	SEC ID Nº: 5
<u>Cadena ligera</u>		
CDR1	agggccagtc agagtgtag cagctactta gcc	SEC ID Nº: 9
CDR2	gatgcatcca acagggccac t	SEC ID Nº: 11
CDR3	cagcagcgta gcaactggcc tccggcg	SEC ID Nº: 13

Los anticuerpos humanos que codifican ADN pueden prepararse recombinando regiones constantes y regiones variables humanas que codifican ADN, distintas de las CDR, derivadas sustancialmente o exclusivamente de las regiones de anticuerpo humano correspondientes y CDR que codifican ADN derivadas de un ser humano (SEC ID N°: 1, 3 y 5 para las CDR del dominio variable de la cadena pesada y SEC ID N°: 9, 11 y 13 para las CDR del dominio variable de la cadena ligera).

Fuentes adecuadas de ADN que codifican fragmentos de anticuerpos incluyen cualquier célula, tal como hibridomas y células del bazo, que expresan el anticuerpo de longitud completa. Los fragmentos pueden usarse por sí mismos como equivalentes de anticuerpo, o pueden recombinarse en equivalentes, como se ha descrito anteriormente. Las delecciones y recombinaciones de ADN descritas en esta sección pueden llevarse a cabo mediante procedimientos conocidos, tales como aquellos descritos en las publicaciones enumeradas anteriormente con respecto a equivalentes de anticuerpos y/u otras técnicas de ADN recombinante convencionales, tales como aquellas descritas más adelante. Otra fuente de ADN son anticuerpos monocatenarios producidos a partir de una biblioteca de expresión en fago, como se conoce en la técnica.

Adicionalmente, la presente divulgación proporciona vectores de expresión que contienen las secuencias de polinucleótidos previamente descritas operativamente ligadas a una secuencia de expresión, un promotor y una secuencia potenciadora. Se ha desarrollado una variedad de vectores de expresión para la eficaz síntesis de polipéptido de anticuerpo en procariontes, tales como bacterias y sistemas eucariotas, que incluyen, pero no se limitan a, sistemas de cultivo celular en levadura y en mamífero. Los vectores de la presente divulgación pueden comprender segmentos de secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético.

Puede usarse cualquier vector de expresión adecuado. Por ejemplo, vectores de clonación procariontes incluyen plásmidos de *E. coli* tales como *colE1*, *pCR1*, *pBR322*, *pMB9*, *pUC*, *pKSM* y *RP4*. Vectores procariontes también incluyen derivados de ADN de fago tales como *M13* y otros fagos de ADN monocatenario filamentosos. Un ejemplo de un vector útil en levadura es el plásmido 2μ . Vectores adecuados para la expresión en células de mamífero incluyen derivados muy conocidos de SV40, adenovirus, secuencias de ADN derivadas de retrovirus y vectores lanzadera derivados de combinación de vectores de mamífero funcionales, tales como aquellos descritos anteriormente, y plásmidos funcionales y ADN de fago.

Vectores de expresión eucariotas adicionales se conocen en la técnica (por ejemplo, P.J. Southern y P. Berg, *J. Mol. Appl. Genet.*, 1, 327-341 (1982); Subramani y col., *Mol. Cell. Biol.*, 1: 854-864 (1981); Kaufmann y Sharp, "Amplification And Expression of Sequences Cotransfected with a Modular Dihydrofolate Reductase Complementary DNA Gene", *J. Mol. Biol.* 159, 601-621 (1982); Kaufmann y Sharp, *Mol. Cell. Biol.* 159, 601-664 (1982); Scahill y col., "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 y Chasin, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 77, 4216-4220, (1980).

Los vectores de expresión útiles en la presente divulgación contienen al menos una secuencia de control de la expresión que está operativamente ligada a la secuencia de ADN o fragmento que va a expresarse. La secuencia de control se inserta en el vector con el fin de controlar y regular la expresión de la secuencia de ADN clonada. Ejemplos de secuencias de control de la expresión útiles son el sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema *tac*, el sistema *trc*, operador principal y regiones promotoras del fago lambda, la región de control de la proteína de la envuelta fd, los promotores de levadura glicolíticos, por ejemplo, un promotor para 3-fosfoglicerato cinasa, los promotores de fosfatasa ácida de levadura, por ejemplo, Pho5, los promotores de los factores de apareamiento alfa de levadura y promotores derivados de polioma, adenovirus, retrovirus y virus simio, por ejemplo, los promotores temprano y tardío o SV40, y otras secuencias conocidas por controlar la expresión de genes de células procariontes o eucariotas y sus virus o combinaciones de los mismos.

La presente divulgación también proporciona células huésped recombinantes que contienen los vectores de expresión previamente descritos. Los anticuerpos pueden expresarse en líneas celulares distintas de en hibridomas. Pueden usarse ácidos nucleicos, que comprenden una secuencia que codifica un polipéptido, para la transformación de una célula huésped de mamífero adecuada.

Líneas celulares de particular preferencia se seleccionan basándose en el alto nivel de expresión, expresión constitutiva de proteína de interés y contaminación mínima de proteínas huésped. Líneas celulares de mamífero disponibles como huéspedes para la expresión son muy conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas, tales como, pero no se limitan a, células NS0, células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón hámster bebé (BHK) y muchas otras. Células eucariotas adicionales adecuadas incluyen levadura y otros hongos. Huéspedes procariontes útiles incluyen, por ejemplo, *E. coli* tales como SG-936 de *E. coli*, HB 101 de *E. coli*, W3110 de *E. coli*, X1776 de *E. coli*, X2282 de *E. coli*, DHI de *E. coli* y MRC1 de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus* tales como *Bacillus subtilis* y *Streptomyces*.

Estas células huésped recombinantes presentes pueden usarse para producir un anticuerpo, o fragmento del mismo, cultivando las células en condiciones que permitan la expresión del anticuerpo o fragmento del mismo y purificando el

anticuerpo o fragmento del mismo de la célula huésped o medio de alrededor de la célula huésped. La elección como diana del anticuerpo expresado o fragmento para la secreción en las células huésped recombinantes puede facilitarse insertando una secuencia codificante de péptido señal o conductor secretor (véase, Shokri y col., Appl Microbiol Biotechnol. 60(6):654-64 (2003), Nielsen y col., Prot. Eng. 10:1-6 (1997) y von Heinje y col., Nucl. Acids Res. 14:4683-4690 (1986)) en el extremo 5' del gen de interés que codifica el anticuerpo. Estos elementos de péptido conductor secretor pueden derivarse de tanto secuencias procariontas como eucariotas. Por consiguiente, adecuadamente, se usan péptidos conductores secretores, que son aminoácidos unidos al extremo N de un polipéptido para dirigir el movimiento del polipéptido fuera del citosol de la célula huésped y secreción en el medio.

Los anticuerpos de la presente divulgación pueden fusionarse con residuos de aminoácidos adicionales. Tales residuos de aminoácidos pueden ser una marca de péptido, quizás para facilitar el aislamiento. También se contemplan otros residuos de aminoácidos para recircular anticuerpos a órganos o tejidos específicos.

En otro aspecto, un anticuerpo de la presente divulgación se prepara expresando un ácido nucleico que codifica el anticuerpo en un animal transgénico, de forma que el anticuerpo se exprese y pueda recuperarse. Por ejemplo, el anticuerpo puede expresarse de una manera específica de tejido que facilita la recuperación y purificación. En un aspecto tal, un anticuerpo se expresa en la glándula mamaria para la secreción durante la lactancia. Animales transgénicos incluyen, pero no se limitan a, ratones, cabra y conejo.

Anticuerpos que pueden usarse incluyen inmunoglobulinas completas, fragmentos de unión a antígeno de inmunoglobulinas, además de proteínas de unión a antígeno que comprenden dominios de unión a antígeno de inmunoglobulinas. Fragmentos de unión a antígeno de inmunoglobulinas incluyen, por ejemplo, Fab, Fab' y F(ab')₂. Se han desarrollado otros formatos de anticuerpo que retienen especificidad de unión, pero tienen otras características que pueden ser deseables, que incluyen, por ejemplo, biespecificidad, multivalencia (superior a dos sitios de unión), tamaño compacto (por ejemplo, dominios de unión solo).

Los anticuerpos monocatenarios carecen de algunos o todos los dominios constantes de los anticuerpos completos de los que se derivan. Por tanto, pueden vencer algunos de los problemas asociados al uso de anticuerpos completos. Por ejemplo, los anticuerpos monocatenarios tienden a estar libres de ciertas interacciones no deseadas entre regiones constantes de la cadena pesada y otras moléculas biológicas. Adicionalmente, los anticuerpos monocatenarios son considerablemente más pequeños que los anticuerpos completos y pueden tener mayor permeabilidad que los anticuerpos completos, permitiendo que anticuerpos monocatenarios se localicen y unan a sitios de unión a antígeno diana más eficazmente. Además, el tamaño relativamente pequeño de anticuerpos monocatenarios hace que sea menos probable que provoquen una respuesta inmunitaria no deseada en un receptor que los anticuerpos completos.

Anticuerpos monocatenarios múltiples, teniendo cada cadena individual un dominio V_H y uno V_L covalentemente ligados por un primer péptido ligador, pueden ligarse covalentemente por al menos uno o más péptidos ligadores para formar un anticuerpo monocatenario multivalente, que puede ser monoespecífico o multiespecífico. Cada cadena de un anticuerpo monocatenario multivalente incluye un fragmento de la cadena ligera variable y un fragmento de la cadena pesada variable, y está ligado por un péptido ligador a al menos otra cadena. El péptido ligador está compuesto por al menos quince residuos de aminoácidos. El máximo número de residuos de aminoácidos es aproximadamente cien.

Dos anticuerpos monocatenarios pueden combinarse para formar un diacuerpo, también conocido como un dímero bivalente. Los diacuerpos tienen dos cadenas y dos sitios de unión, y pueden ser monoespecíficos o biespecíficos. Cada cadena del diacuerpo incluye un dominio V_H conectado a un dominio V_L. Los dominios están conectados con ligadores que son suficientemente cortos para prevenir el apareamiento entre dominios en la misma cadena, accionándose así el apareamiento entre dominios complementarios en diferentes cadenas para volver a crear los dos sitios de unión a antígeno.

Tres anticuerpos monocatenarios pueden combinarse para formar triacuerpos, también conocidos como trímeros trivalentes. Los triacuerpos se construyen con el extremo de aminoácido de un dominio V_L o V_H directamente fusionado con el extremo carboxilo de un dominio V_L o V_H, es decir, sin ninguna secuencia de ligador. El triacuerpo tiene tres cabezas de Fv con los polipéptidos dispuestos en un modo de cabeza a cola cíclico. Una conformación posible del triacuerpo es plana con los tres sitios de unión localizados en un plano a un ángulo de 120 grados entre sí. Los triacuerpos pueden ser monoespecíficos, biespecíficos o trispecíficos.

Así, anticuerpos de la presente divulgación y fragmentos de los mismos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos que se producen naturalmente, fragmentos bivalentes tales como (Fab')₂, fragmentos monovalentes tales como Fab, anticuerpos monocatenarios, Fv monocatenario (scFv), anticuerpos de un único dominio, anticuerpos monocatenarios multivalentes, diacuerpos, triacuerpos, y similares que se unen específicamente con antígenos.

Los anticuerpos anti-IGF-IR y anti-PDGFR α o fragmentos de anticuerpos, que pueden internalizarse tras la unión a células que llevan IGF-IR (documento WO2005016970) o PDGFR α , pueden ligarse químicamente o biosintéticamente a agentes antitumorales. Los agentes antitumorales ligados a un anticuerpo tal incluyen cualquier agente que destruya

o dañe un tumor al que el anticuerpo se ha unido o en el entorno de la célula al que el anticuerpo se ha unido. Por ejemplo, un agente antitumoral es un agente tóxico tal como un agente quimioterapéutico o un radioisótopo. Agentes quimioterapéuticos adecuados son conocidos para los expertos en la materia e incluyen antraciclinas (por ejemplo, daunomicina y doxorubicina), metotrexato, vindesina, neocarzinostatina, cis-platino, clorambucilo, citosina arabinósido, 5-fluorouridina, melfalan, ricina y caliqueamicina. Los agentes quimioterapéuticos se conjugan con el anticuerpo usando procedimientos convencionales (véase, por ejemplo, Hermentin y Seiler, Behring Inst. Mitt. 82:197-215(1988)).

Radioisótopos adecuados para su uso como agentes antitumorales también son conocidos para los expertos en la materia. Por ejemplo, se usa ^{131}I o ^{211}At . Estos isótopos se unen al anticuerpo usando técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Pedley y col., Br. J Cancer 68, 69-73(1993)).

Alternativamente, el agente antitumoral que está unido al anticuerpo es una enzima que activa un profármaco. De esta forma, se administra un profármaco que permanece en su forma inactiva hasta que alcance el sitio diana en el que se convierte en su forma de citotoxina. En la práctica, el conjugado anticuerpo-enzima se administra al paciente y se deja que se localice en la región del tejido que va a tratarse. Entonces, el profármaco se administra al paciente de manera que la conversión en el fármaco citotóxico se produzca en la región del tejido que va a tratarse.

Otros agentes antitumorales incluyen citocinas tales como interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4) o factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). El anticuerpo elige como diana la citocina para el tumor de manera que la citocina medie en el daño a o la destrucción del tumor sin afectar otros tejidos. La citocina puede conjugarse con el anticuerpo al nivel de ADN usando técnicas de ADN recombinante convencionales.

En ciertos aspectos, anticuerpos anti-IGF-IR o anti-PDGFR α se administran en combinación con uno o más agentes antineoplásicos. Para ejemplos de terapias de combinación véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. n $^{\circ}$ 6.217.866 (Schlessinger y col.) (Anticuerpos anti-EGFR en combinación con agentes antineoplásicos); documento WO 99/60023 (Waksal y col.) (Anticuerpos anti-EGFR en combinación con radiación). Puede usarse cualquier agente antineoplásico adecuado, tal como un agente quimioterapéutico, radiación o combinaciones de los mismos. El agente antineoplásico puede ser un agente alquilante o un antimetabolito. Ejemplos de agentes alquilantes incluyen, pero no se limitan a, cisplatino, ciclofosfamida, melfalan y dacarbazina. Ejemplos de antimetabolitos incluyen, pero no se limitan a, doxorubicina, daunorubicina y paclitaxel, gemcitabina.

Agentes antineoplásicos útiles también incluyen inhibidores mitóticos tales como los taxanos docetaxel y paclitaxel. Los inhibidores de la topoisomerasa son otra clase de agentes antineoplásicos que pueden usarse en combinación con anticuerpos de la invención. Éstos incluyen inhibidores de la topoisomerasa I o la topoisomerasa II. Los inhibidores de la topoisomerasa I incluyen irinotecan (CPT-11), aminocamptotecina, camptotecina, DX-8951f, topotecan. Los inhibidores de la topoisomerasa II incluyen etopósido (VP-16) y tenipósido (VM-26). Otras sustancias están siendo actualmente evaluadas con respecto a la actividad inhibidora de la topoisomerasa y eficacia como agentes antineoplásicos. En un aspecto preferido, el inhibidor de la topoisomerasa es irinotecan (CPT-11).

En un aspecto particular, un anticuerpo anti-IGF-IR se administra en combinación con docetaxel. Un anticuerpo anti-PDGFR α se administra en combinación con doxorubicina.

Cuando el agente antineoplásico es radiación, la fuente de la radiación puede ser tanto externa (radioterapia de haz externo - EBRT) como interna (braquiterapia - BT) al paciente que está tratándose. La dosis de agente antineoplásico administrada depende de numerosos factores, que incluyen, por ejemplo, el tipo de agente, el tipo y gravedad del tumor que está tratándose y la vía de administración del agente. Debe enfatizarse, sin embargo, que la presente invención no se limita a ninguna dosis particular.

Los tratamientos con anticuerpo (anti-IGF-IR o anti-PDGFR α) y anticuerpo más agente antineoplásico también pueden usarse para pacientes que reciben terapia hormonal adyuvante (por ejemplo, para cáncer de mama) o terapia de privación de andrógenos (por ejemplo, para cáncer de próstata).

Los antagonistas anti-IGF-IR y anti-PDGFR α pueden coadministrarse o administrarse con antagonistas de receptores que neutralizan otros receptores que participan en el crecimiento o angiogénesis tumoral. Por ejemplo, se coadministran un anticuerpo anti-IGF-IR y un anticuerpo anti-PDGFR α . En un aspecto en el que una célula tumoral expresa tanto IGF-IR como PDGFR α , elementos de transducción de señales comunes se activan por transducción de señales mediante cada receptor. Aunque la inhibición de un receptor producirá generalmente la disminución de la activación de los componentes aguas abajo comunes, la inhibición de ambos receptores disminuirá adicionalmente la activación. En otro aspecto, ciertas células en un tumor o tejido circundante expresan cantidades significativas de un receptor, y otras células expresan cantidades significativas del segundo receptor. La coadministración de los antagonistas reduce el crecimiento de la célula tumoral y la estimulación paracrina de células circundantes.

Un anticuerpo biespecífico puede proporcionarse como una alternativa a la coadministración. Existe una variedad de

anticuerpos biespecíficos que se diseñan para incorporar diversas características deseables. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos tienen tamaño mínimo. Anticuerpos biespecíficos con cuatro sitios de unión a antígeno (dos para cada especificidad de unión) tienen avideces de unión que son similares a aquellas de anticuerpos naturales correspondientes. Ciertos anticuerpos biespecíficos incorporan regiones Fc, reciclando así funciones efectoras (por ejemplo, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)) de anticuerpos naturales. El documento WO 01/90192 describe anticuerpos tetravalentes similares a IgG. El documento WO2006/02025 describe un anticuerpo tetravalente que incorpora dos anticuerpos y retiene funciones efectoras.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-IGF-IR o un anticuerpo anti-PDGFR α u otro antagonista se usa en combinación con un antagonista de receptor que se une específicamente a un receptor de factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo, EGFR, Her2/erbB2, erbB3, erbB4). Particularmente se prefieren proteínas de unión a antígeno que se unen al dominio extracelular de EGFR y bloquean la unión de uno o más de sus ligandos y/o neutralizan la activación inducida por ligando de EGFR. Los antagonistas de EGFR también incluyen anticuerpos que se unen a un ligando de EGFR e inhiben la unión de EGFR a su ligando. Ligandos para EGFR incluyen, por ejemplo, EGF, TGF- α , anfiregulina, EGF de unión a heparina (HB-EGF) y betacelulina. Se cree que EGF y TGF- α son los principales ligandos endógenos que producen estimulación mediada por EGFR, aunque se ha mostrado que TGF- α es más potente en promover la angiogénesis. Antagonistas de EGFR también incluyen sustancias que inhiben la dimerización de EGFR con otras subunidades de receptor EGFR (es decir, homodímeros de EGFR) o heterodimerización con otros receptores de factores de crecimiento (por ejemplo, HER2). Antagonistas de EGFR adicionales incluyen moléculas biológicas y moléculas pequeñas, tales como inhibidores de cinasas sintéticos que actúan directamente sobre el dominio citoplásmico de EGFR para inhibir la transducción de señales mediada por EGFR. Erbitux® (cetuximab) es un ejemplo de un antagonista de EGFR que se une a EGFR y bloquea la unión a ligando. Un ejemplo de un antagonista de EGFR de molécula pequeña es IRESSA™ (ZD1939), que es un derivado de quinozalina que funciona como mimético de ATP para inhibir EGFR. Véase la patente de EE.UU. nº 5.616.582 (Zeneca Limited); documento WO 96/33980 (Zeneca Limited) en la pág. 4; véase, por tanto, Rowinsky y col., Resumen 5 presentado en la 37ª Reunión anual de ASCO, San Francisco, CA, 12-15 de mayo de 2001; Anido y col., Resumen 1712 presentado en la 37ª Reunión anual de ASCO, San Francisco, CA, 12-15 de mayo de 2001. Otro ejemplo de un antagonista de EGFR de molécula pequeña es Tarceva® (OSI-774), que es un derivado de inhibidor de EGFR de 4-(fenilamino sustituido)quinozalina [clorhidrato de 6,7-bis(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-4-il]-(3-etinil-fenil)amina]. Véase el documento WO 96/30347 (Pfizer Inc.) en, por ejemplo, página 2, línea 12 a página 4, línea 34 y página 19, líneas 14-17. Véase también Moyer y col., Cancer Res., 57: 4838-48 (1997); Pollack y col., J. Pharmacol., 291: 739-48 (1999). Tarceva® puede funcionar inhibiendo la fosforilación de EGFR y sus rutas de transducción de señales de las cinasas PI3/Akt y MAP (proteína activada por mitógeno) aguas abajo produciendo la detención del ciclo celular mediada por p27. Véase Hidalgo y col., Resumen 281 presentado en la 37ª Reunión anual de ASCO, San Francisco, CA, 12-15 de mayo de 2001.

También se informa que otras moléculas pequeñas inhiben EGFR, muchas de las cuales se cree que son específicas para el dominio de tirosina cinasa de un EGFR. Algunos ejemplos de tales antagonistas de EGFR de molécula pequeña se describen en los documentos 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) y WO 00/31048 (Warner Lambert Company). Ejemplos de antagonistas de EGFR de molécula pequeña específicos incluyen CI-1033 (Pfizer), que es un inhibidor de tirosina cinasas de quinozalina (N-[4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-7-(3-morfolin-4-il-propoxi)-quinazolin-6-il]-acrilamida), particularmente EGFR y se describe en el documento WO 00/31048 en la página 8, líneas 22-6; PKI166 (Novartis), que es un inhibidor de EGFR de pirrolopirimidina y se describe en el documento WO 97/27199 en las páginas 10-12; GW2016 (GlaxoSmithKline), que es un inhibidor de EGFR y HER2; EKB569 (Wyeth), que se informa que inhibe el crecimiento de células tumorales que expresan en exceso EGFR o HER2 *in vitro* e *in vivo*; AG-1478 (Tyrphostin), que es una molécula pequeña de quinazolina que inhibe la señalización de tanto EGFR como erbB-2; AG-1478 (Sugen), que es un inhibidor de bisustrato que también inhibe la proteína cinasa CK2; PD 153035 (Parke-Davis) que se informa que inhibe la actividad de cinasas de EGFR y crecimiento tumoral, induce apoptosis en células en cultivo y potencia la citotoxicidad de agentes citotóxicos quimioterapéuticos; SPM-924 (Schwarz Pharma), que es un inhibidor de tirosina cinasas dirigido para el tratamiento de cáncer de próstata; CP-546.989 (OSI Pharmaceuticals), que es supuestamente un inhibidor de la angiogénesis para el tratamiento de tumores sólidos; ADL-681, que es un inhibidor de cinasas de EGFR dirigido para el tratamiento de cáncer; PD 158780, que es una piridopirimidina que se informa que inhibe la tasa de crecimiento tumoral de xenoinjertos A4431 en ratones; CP-358.774, que es una quinazolina que se informa que inhibe la autofosforilación en xenoinjertos HN5 en ratones; ZD1839, que es una quinazolina que se informa que tiene actividad antitumoral en modelos de xenoinjerto de ratón que incluyen cánceres de vulva, NSCLC, próstata, ovario y colorrectal; CGP 59326A, que es una pirrolopirimidina que se informa que inhibe el crecimiento de xenoinjertos positivos para EGFR en ratones; PD 165557 (Pfizer); CGP54211 y CGP53353 (Novartis), que son dianilnoftalimidias. Los inhibidores de tirosina cinasas de EGFR naturalmente derivados incluyen genisteína, herbimicina A, quercetina y erbstatina.

Otras moléculas pequeñas que se informó que inhibían EGFR son compuestos tricíclicos tales como los compuestos

descritos en la patente de EE.UU. nº 5.679.683; derivados de quinazolina tales como los derivados descritos en la patente de EE.UU. nº 5.616.582; y compuestos de indol tales como los compuestos descritos en la patente de EE.UU. nº 5.196.446.

Otro receptor que puede elegirse como diana junto con IGF-IR o PDGFR α es un receptor de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR). Un anticuerpo anti-IGF-IR o anticuerpo anti-PDGFR α se usa en combinación con un antagonista de VEGFR. En una realización se usa un antagonista que se une específicamente al receptor VEGFR-1/Flt-1. En otro aspecto, el antagonista de VEGFR se une específicamente al receptor VEGFR-2/KDR. Particularmente se prefieren proteínas de unión a antígeno que se unen al dominio extracelular de VEGFR-1 o VEGFR-2 y bloquean la unión por sus ligandos (VEGFR-2 se estimula muy fuertemente por VEGF; VEGFR-1 se estimula muy fuertemente por PIGF, pero también por VEGF) y/o neutralizan la activación inducida por ligando. Por ejemplo, IMC-1121 es un anticuerpo humano que se une a y neutraliza VEGFR-2 (documento WO 03/075840; Zhu). Otro ejemplo es el mAb 6.12 que se une a VEGFR-1 soluble y expresado en la superficie celular. ScFv 6.12 comprende los dominios V_L y V_H del anticuerpo monoclonal de ratón MAb 6.12. Una línea celular de hibridoma que produce MAb 6.12 se ha depositado como el número de ATCC PTA-3344 bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para los fines del procedimiento de patente y las reglamentaciones en virtud del mismo (Tratado de Budapest). En otro aspecto, el antagonista de VEGFR se une a un ligando de VEGFR y bloquea la activación de un VEGFR por el ligando. Por ejemplo, Avastin® (bevacizumab) es un anticuerpo que se une a VEGF.

Otros ejemplos de receptores de factores de crecimiento que participan en la tumorigénesis son el factor de crecimiento nervioso (NGFR) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR).

En un aspecto alternativo adicional, los anticuerpos anti-IGF-IR y anti-PDGFR α o pueden administrarse en combinación con uno o más adyuvantes adecuados tales como, por ejemplo, citocinas (IL-10 y IL-13, por ejemplo) u otros inmunoestimulantes tales como, pero no se limitan a, quimiocina, antígenos asociados a tumor y péptidos. Véase, por ejemplo, Larrivé e y col., arriba. Debe apreciarse, sin embargo, que la administración de solo un anticuerpo anti-IGF-IR o anti-PDGFR α es suficiente para prevenir, inhibir o reducir la progresión del tumor de una manera terapéuticamente eficaz.

En una terapia de combinación, el anticuerpo anti-IGF-IR o anti-PDGFR α se administra antes, durante o después de comenzar terapia con otro agente, además de cualquier combinación de los mismos, es decir, antes y durante, antes y después, durante y después, o antes, durante y después de comenzar la terapia con agente antineoplásico. Por ejemplo, el anticuerpo puede administrarse entre 1 y 30 días, preferentemente 3 y 20 días, más preferentemente entre 5 y 12 días antes de comenzar radioterapia. En un aspecto preferido, la quimioterapia se administra simultáneamente con o, más preferentemente, posterior a la terapia con anticuerpo.

Puede usarse cualquier procedimiento adecuado o vía para administrar anticuerpos de la invención, y opcionalmente, para co-administrar agentes antineoplásicos y/o antagonistas de otros receptores. Las pautas de agentes antineoplásicos utilizadas según la invención incluyen cualquier pauta que se cree que es óptimamente adecuada para el tratamiento de la afección neoplásica del paciente. Diferentes tumores malignos pueden requerir el uso de anticuerpos antitumorales específicos y agentes antineoplásicos específicos, que se determinarán en una base paciente por paciente. Las vías de administración incluyen, por ejemplo, administración oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. La dosis de antagonista administrada depende de numerosos factores, que incluyen, por ejemplo, el tipo de antagonistas, el tipo y gravedad del tumor que está tratándose y la vía de administración de los antagonistas. Debe enfatizarse, sin embargo, que la presente divulgación no se limita a ningún procedimiento o vía de administración particular.

Un experto en la materia entenderá que las dosificaciones y frecuencia de tratamiento dependen de la tolerancia del paciente individual y de las propiedades farmacológicas y farmacocinéticas del agente de bloqueo o inhibidor usado. Idealmente, se desea lograr farmacocinética saturable para el agente usado. Una dosis de carga para tanto los anticuerpos anti-IGF-IR como anti-PDGFR α puede oscilar, por ejemplo, de aproximadamente 10 a aproximadamente 1400 mg/m², preferentemente de aproximadamente 200 a aproximadamente 400 mg/m². Ésta puede ir seguida de varias dosificaciones diarias o semanales adicionales que oscilan, por ejemplo, de aproximadamente 200 a aproximadamente 400 mg/m². El paciente se monitoriza para efectos secundarios y el tratamiento se detiene cuando tales efectos secundarios son graves.

Un experto en la materia también sabrá cómo monitorizar el progreso del tratamiento con el fin de determinar una dosis eficaz. Para metástasis óseas de cáncer de próstata, una forma tal es monitorizar niveles de PSA. Otras formas para monitorizar metástasis óseas incluyen gammagrafías óseas y RMN.

Para pacientes para los que la pérdida ósea inducida por tratamiento para el cáncer (CTIBL) es un riesgo o problemática (por ejemplo, pacientes que reciben terapia hormonal adyuvante para cáncer de mama o terapia de privación de andrógenos para cáncer de próstata), cualquier tratamiento anteriormente mencionado puede

complementarse por la administración de agentes para la prevención de CTIBL, tales como bisfosfonatos. Los bisfosfonatos incluyen, por ejemplo, clodronato, risedronato y ácido zoledrónico.

Descripciones detalladas de procedimientos convencionales, tales como aquellos empleados en la construcción de vectores y plásmidos, y expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse de numerosas publicaciones, que incluyen Sambrook, J y col., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press; Coligan, J. y col. (1994) *Current Protocols in Immunology*, Wiley & Sons, Incorporated; Enna, S.J. y col. (1991) *Current Protocols in Pharmacology*, Wiley & Sons, Bonifacino, J.S. y col. (1999) *Current Protocols in Cell Biology*, Wiley & Sons.

Ejemplos

10 Ejemplo 1 (PARA REFERENCIA SOLAMENTE)

Efectos de IMC-A12 y docetaxel sobre el crecimiento tumoral. Fragmentos de tumor (20 a 30 mm³) de LuCaP 35V independiente de andrógenos (IA) se implantaron subcutáneamente (s.c.) en 32 ratones SCID castrados de seis semanas de edad, respectivamente, como se describe previamente (4). Cuando se observó que el tumor implantado alcanzaba un volumen de 150-200 mm³, los animales se aleatorizaron en cuatro grupos para los estudios de tratamiento. Los animales del grupo 1 recibieron tratamiento con docetaxel a una dosis de 20 mg/kg. Los animales del grupo 2 recibieron tratamiento con docetaxel a una dosis de 10 mg/kg. Los animales del grupo 3 recibieron tratamiento combinado de 10 mg/kg de docetaxel y 40 mg/kg de A12. Los animales del grupo 4 recibieron tratamiento combinado de 20 mg/kg de docetaxel y 40 mg/kg de A12. Todos los tratamientos se administraron intraperitonealmente (ip). El docetaxel se administró una vez a la semana. A12 se administró tres veces a la semana. Todos los animales se trataron durante cuatro semanas y se monitorizaron durante cuatro semanas adicionales antes de la eutanasia. Los tumores se midieron dos veces a la semana y el volumen del tumor se estimó por la fórmula: volumen = $L \times W^2/2$. Siguiendo el protocolo para animales aprobado por el IACUC de la Universidad de Washington, algunos animales se sacrificaron antes cuando el tumor alcanzó un volumen de 1000 mm³ o cuando la pérdida de peso del animal superó el 20 % del peso corporal inicial. Los animales se pesaron dos veces a la semana. Se recogieron muestras de sangre del seno orbital semanalmente. Se separó el suero y el nivel de PSA se determinó usando el ensayo de PSA total IMx (Abott Laboratories, Abott Park, IL). BrdU se inyectó en los tumores 1 h antes de sacrificar los animales para la evaluación de la tasa de proliferación de células tumorales *in vivo*.

Después de la eutanasia, los tumores se recogieron y se dividieron en dos. Una porción de los tumores se fijó en 10 % de tampón formalina neutra (NFB) y se incorporó en parafina. Se prepararon secciones de cinco micrómetros para tinción inmunohistoquímica (IHC). La porción restante de los tumores se separó mecánicamente en células individuales troceando y filtrando a través de tamices de nailon de 70 µm.

Como se muestra en la Fig. 1, el xenoinjerto de LuCaP 35V creció agresivamente en ratones a una tasa de crecimiento promedio de $362,0 \pm 72,0$ mm³/semana sin ningún tratamiento. Todos los animales en el grupo no tratado tuvieron que sacrificarse en el plazo de tres semanas después del inicio del tratamiento en grupos experimentales debido a que el volumen del tumor superaba 1000 mm³. Cuando los animales se trataron con 40 µg/kg de A12 solo, la tasa de crecimiento tumoral se redujo a $192,7 \pm 35,6$ mm³/semana durante el tratamiento. Cuando se administró docetaxel a los animales a una dosis de 10 mg/kg, la tasa de crecimiento tumoral de LuCaP 35V se redujo a un promedio de $29,6 \pm 6,1$ mm³/semana. Cuando docetaxel se administró en combinación con tratamiento de A12, la tasa de crecimiento tumoral de LuCaP 35V se redujo adicionalmente a un promedio de $7,9 \pm 1,0$ mm³/semana (Fig. 1b). El efecto de la inhibición de docetaxel combinado con A12 persistió durante más de cuatro semanas después de la terminación de los tratamientos. Cuando se administró una mayor dosis de docetaxel (20 mg/kg) a los animales, independientemente con o sin tratamiento de A12 combinado, el volumen del tumor no aumentó durante el periodo de tratamiento de cuatro semanas; a diferencia, se observó una tendencia de volúmenes de tumor reducidos. Sin embargo, en las cuatro semanas tras la terminación del tratamiento, la reducción de los volúmenes de tumor continuó en el grupo de animales tratados con docetaxel combinado con A12. A diferencia, los volúmenes de tumor estuvieron aumentando a una tasa promedio de $27,0 \pm 16,1$ mm³/semana en el grupo de animales tratados con docetaxel solo. Estos resultados han sugerido que, en una dosis dada de docetaxel, el tratamiento combinado con A12 puede potenciar el efecto inhibitorio de docetaxel sobre el crecimiento tumoral durante el tratamiento o después de seguimientos del tratamiento.

PSA es un parámetro clínico comúnmente usado para evaluar el crecimiento de tumor de próstata. Se midieron niveles de PSA en suero en animales durante y después de los tratamientos. Como se muestra en la Fig. 1c, en animales tratados con A12 y docetaxel o 20 mg/kg de docetaxel solo, no se observó cambio significativo en niveles de PSA en suero durante el tratamiento de cuatro semanas, de acuerdo con el crecimiento tumoral suprimido. Después de la terminación del tratamiento, el nivel de PSA en suero se mostró elevado en animales tratados con docetaxel solo y, a diferencia, era coherente o incluso disminuyó en animales tratados con docetaxel en combinación con A12. Estos datos están de acuerdo con la inhibición después del tratamiento continuada del crecimiento tumoral en animales tratados con docetaxel y A12.

Inducción de apoptosis por docetaxel combinado con anticuerpo anti-IGF-IR. El efecto *in vivo* combinado de docetaxel y tratamiento con A12 sobre el ciclo celular y la supervivencia celular en el criterio de valoración experimental se midió por ensayo de marcado de extremos cortados mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL) y tinción con propidio (PI) usando el kit Apop-Direct (BD BioScience) como se describe previamente. Brevemente, 1×10^6 células de la suspensión de una única célula se fijaron con 10 % de tampón formalina neutra (NBF) seguido de 70 % de alcohol etanólico a -20 °C durante 30 min. Después de varios lavados, las células se permeabilizaron con 0,1 % de Triton X-100 y se incubaron con dUTP conjugado con FITC y enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) a 37 °C durante 1 h, seguido de una incubación con tampón PI/RNasa (100 µg/ml de PI, 50 µg/ml de RNasa) a temperatura ambiente durante 60 min. Las muestras se analizaron por citometría de flujo usando un BD FACscan. Los datos se analizaron con el software CellQuest^{PRO}.

Cuatro semanas después de la terminación del tratamiento, la apoptosis se detectó en un porcentaje significativo de tumores de animales que se habían tratado con docetaxel (66,7 % en el grupo tratado con 10 mg/kg de docetaxel y 77,8 % en el grupo tratado con 20 mg/kg de docetaxel) en combinación con A12 (Fig. 2b y Tabla 1), independientemente de la dosificación de docetaxel que se usó. Los eventos apoptóticos promedio en estos tumores se produjeron a una tasa del $15,0 \pm 4,3$ %. No se detectó apoptosis en tumores en animales que se trataron con docetaxel solo. En su lugar, la mayoría (88 % en el grupo tratado con 10 mg/kg de docetaxel y 100 % en el grupo tratado con 20 mg/kg de docetaxel) de los tumores avanzaron al ciclo celular normal (Fig. 2a y Tabla 3).

Tratamiento	Apoptosis (%)	Detención de G1 (%)	Detención de G2 (%)	Ciclo normal (%)
Ninguno	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 evaluar adicionalmente la capacidad de proliferación de células tumorales después de diferente terminación del tratamiento, la sección en parafina se tiñó con anticuerpo anti-BrDu. Las muestras tumorales se fijaron en 10 % de NBF, se incorporaron en parafina y se seccionaron a 5 µm sobre portaobjetos. Después de la desparafinización y rehidratación, los antígenos se recuperaron con ácido cítrico 0,01 M (pH 6,0) a 95 °C durante 2 X 5 min. Los portaobjetos se dejaron enfriar durante 30 min, seguido de aclarado secuencial con PBS. La actividad de peroxidasa endógena se inactivó por una incubación con 0,3 % de H₂O₂ en metanol durante 15 min. Después de bloquear con 1,5 % de suero de cabra normal en PBS que contenía 0,05 % de Tween 20 (PBST) durante 1 h, los portaobjetos se incubaron con anticuerpo de ratón anti-BrDu (1 µg/ml) durante 1 h, seguido de incubación secuencial con anticuerpo de cabra biotinilado dirigido contra IgG de ratón durante 30 min, avidina marcada con peroxidasa durante 30 min (Santa Cruz Biotechnology) y sustrato cromógeno de diaminobencidina (DAB) / peróxido de hidrógeno (Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 5-10 min. Todas las etapas de incubación se realizaron a temperatura ambiente. Los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina (Sigma) y se montaron en Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, New Jersey). Para control negativo se usó IgG de ratón (Vector Laboratories) en lugar del anticuerpo anti-BrDu primario. Los portaobjetos se examinaron bajo un Microscopio Zeiss y se obtuvieron imágenes digitales. Los números de núcleos marcados con BrdU y núcleos totales se recogieron de 10 vistas al azar de cada sección. El índice de proliferación se calculó por el número de núcleos positivos para BrdU dividido entre el número total de núcleos. Se contaron diez campos por portaobjetos. Se realizaron tinciones con H&E usando hematoxilina y eosina (Richard Allen, Kalamazoo, MI).

En animales que se trataron con docetaxel y A12, la captación de BrDu fue significativamente inferior a aquellos tratados con la misma dosis de docetaxel solo (Fig. 3). Estos datos de incorporación de BrDu están de acuerdo con las observaciones anteriores de ciclo celular y apoptosis, sugiriendo que A12 potenció significativamente la citotoxicidad de docetaxel.

Regulación diferencial de la expresión génica en tumores tratados con docetaxel combinado con anticuerpo anti-IGF-IR frente a docetaxel solo. Para determinar posibles mecanismos para el efecto marcadamente potenciado de docetaxel por A12, la expresión de IGF-IR se examinó en todos los tumores recogidos por inmunohistoquímica y análisis de citometría de flujo. No hubo diferencia en la expresión de IGF-IR superficial entre todos los grupos de tratamiento o en comparación con el grupo de control (datos no mostrados). La expresión génica después del

tratamiento se examinó usando análisis de micromatrices de ADNc en tumores de animales que habían recibido 20 mg/kg de docetaxel y 20 mg/kg de docetaxel combinado con A12. Basándose en el análisis de SAM, 49 genes se identificaron como diferencialmente expresados en tumores que recibieron tratamiento combinado de docetaxel y A12 en comparación con aquellos que recibieron docetaxel solo, con más de 2 veces de cambio y menos del 10 % de tasa de descubrimiento falso (FDR) (datos no mostrados). Se identificaron trece genes que participan posiblemente en la regulación de la apoptosis o ciclo celular (Tabla 4). Los 13 genes fueron al menos 2 veces diferentes entre los dos tratamientos y tuvieron una FDR inferior al 0,02 %. Nueve genes se regularon por disminución y cuatro genes se regularon por incremento en tumores tratados con docetaxel y A12, con respecto a tumores tratados con docetaxel solo.

Tabla 4 - Expresión génica diferencial después del tratamiento en tumores tratados con docetaxel + A12 en comparación con tumores tratados con docetaxel solo.

HUGO	Nombre	Función de GO	Veces de cambio	FDR
Genes regulados por disminución				
CDC2	Ciclo 2 de la división celular	citocinesis; mitosis;	3,0	≤0,02 %
CDC6	mg homólogo a ciclo 6 de la división celular CDC6	regulación negativa de la proliferación celular	2,2	≤0,02 %
CCNA2	Ciclina A2	regulación de actividad de CDK	2,1	≤0,02 %
MYBL2	2 similar a homólogo (aviar) del oncogén viral de la mieloblastosis V-myb	antiapoptosis; desarrollo; regulación del ciclo celular;	3,2	≤0,02 %
TUBB	Polipéptido de tubulina-beta	resistencia de taxanos al movimiento basado en microtúbulos	2,3	≤0,02 %
K-ALPHA-1	Tubulina-alfa ubicua	resistencia de taxanos al movimiento basado en microtúbulos	2,5	≤0,02 %
BIRC5	5 que contiene repetición de IAP baculoviral (survivina)	antiapoptosis	2,5	≤0,02 %
CDC25B	Ciclo 25B de la división celular	regulación positiva de la proliferación celular	2,0	≤0,02 %
MYC	Homólogo (aviar) del oncogén viral de la mielocitomatosis V-myc	detención del ciclo celular;	2,5	≤0,02 %
Genes regulados por incremento				
TOB1	Transductor de ERBB21	regulación negativa de la proliferación celular	2,2	≤0,02 %
CCNG2	Ciclina G2	punto de regulación del ciclo celular	2,1	≤0,02 %
IGFBP3	Proteína 3 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina	regulación del crecimiento celular, pro-apoptósico	2,0	≤0,02 %
BIRC3	3 que contiene repetición de IAP baculoviral	antiapoptosis; receptor de la transducción de señales ligadas a la superficie celular	2,2	≤0,02 %

10

Para genes seleccionados, los resultados se confirmaron por RT-PCR en tiempo real. Se purificó un fragmento de PCR patrón de ADNc diana. Se usó una serie de diluciones de los patrones de 10 ng/μl a 10⁻³ pg/μl para RT-PCR en tiempo real para generar curvas patrón. Un μg de ARN total de cada grupo de tumor reunido se usó para la síntesis de ADNc de la primera hebra usando el sistema de síntesis de la primera hebra Superscript (Invitrogen). La RT-PCR en tiempo real se realizó en 20 μl de mezcla de reacción que contenía 1 μl de la primera hebra de ADNc, conjuntos de cebadores

15

específicos y Lightcycler FastStart DNA Master Plus SYBR Green usando un Lightcycler de Roche siguiendo el protocolo del fabricante (Roche, Nutley, NJ). Los productos de RT-PCR se sometieron a análisis de la curva de fusión usando el software Lightcycler v3.5. Los tamaños de amplicón se confirmaron por electroforesis en gel de agarosa. Cada muestra se ensayó por duplicado. Los resultados se muestran en la Fig. 4.

- 5 De los genes regulados por disminución, se ha mostrado que TUBB produce resistencia a docetaxel (Tanaka y col., 2004, Int. J. Cancer 111, 617-26) y se ha mostrado que la elevada expresión de BIRC 5 (survivina) se asocia a cáncer de próstata agresivo y resistencia a terapia antiandrogénica (de Angelis y col., 2004, Int. J. Oncol. 24, 1279-88; Zhang y col., 2005, Oncogene 24, 2474-82). Adicionalmente, TUBB es un gen regulado por IGF-IR que participa con la transformación mediada por IGF-IR (Loughran y col., 2005, Oncogene 24, 6185-93). De los cuatro genes regulados por
10 incremento se ha mostrado que IGFBP3 inhibe la señalización del ligando de IGF, además de inducir apoptosis en células tumorales de próstata en un modo dependiente de ligando (Grimberg y col., 2000, J. Cell. Physiol. 183, 1-9).

Niveles de A12 en suero después del tratamiento. Los niveles de A12 en suero se midieron en animales que habían recibido docetaxel combinado con A12. Los niveles de A12 en suero disminuyeron 100 veces dos semanas después del cese del tratamiento y se detectó a un nivel muy bajo cuatro semanas después del cese del tratamiento (Fig. 5).

- 15 **Citotoxicidad global.** Se examinó la citotoxicidad de la coadministración de docetaxel y IMC-A12. Aunque A12 tiene más del 95 % de reactividad cruzada con IGF-IR murino, no se observaron actividad diaria anormal o cambios de comportamiento en animales tratados con reactivos combinados o docetaxel solo en comparación con animales que portan tumor de control. No se observó efecto significativo sobre células renales en ningún grupo de tratamiento por tanto ensayos del ciclo celular como de apoptosis (datos no mostrados). No se observó cambio significativo en el peso
20 corporal entre los grupos de tratamiento (Fig. 6).

Terapia de anticuerpo anti-IGF-IR para metástasis óseas. La eficacia de tratamiento con anticuerpos anti-IGF-IR sobre el crecimiento metastásico de células de cáncer de próstata en hueso se evaluó usando células de cáncer de próstata inyectadas directamente en la tibia de ratones SCID. Por este procedimiento, los tumores metastásicos se establecen directamente sin dependencia de la invasión dependiente de quimiotaxia de la circulación. Están
25 disponibles una variedad de líneas tumorales para establecer metástasis óseas. Éstas incluyen células PC-3, LuCaP35 y LnCaP que producen lesiones osteolíticas y células LuCaP 23.1 que producen lesiones osteoblásticas.

- Las células LuCaP 23.1, que expresan IGF-1R, tienen una tasa de crecimiento de ~80 % en el entorno del hueso y producen reacciones osteoblásticas. En experimentos preliminares, muestras de LuCaP 23.1 presentaron un aumento significativo en el volumen del hueso frente al volumen de tejido (% de VH/VT) en tumor frente a tibias de control (254-503 % de control, $p=0,024$). Todos los tumores de LuCaP 23.1 en tibias presentaron nuevas trabéculas óseas, que no estaban presentes en las muestras normales, y un alto número de focos de tumor, que habían sustituido la médula ósea normal. En algunos especímenes, el crecimiento de tumor y hueso se extendió fuera del hueso original. También se observó elevado % de VH/VT de muestras de LuCaP 23.1 después de la castración; el % de VH/VT de tibias con tumor fue del 212-354 % del de tibias sin tumor ($p=0,024$). Los resultados observados para los xenoinjertos intra-tibiales de LuCaP 23.1 son indicativos de formación ósea *de novo* estimulada por células tumorales. Además, los tumores muestran muchas similitudes con muestras humanas de metástasis óseas osteoblásticas, que incluyen grandes números de focos de tumor y elevadas cantidades de hueso mineralizado.

- Para evaluar la eficacia del tratamiento con IMC-A12, tumores de xenoinjerto de LuCaP 23.1 se injertaron en ratones SCID, y los niveles de PSA en suero se midieron cada dos semanas para evaluar el crecimiento tumoral. Todos los animales se castraron dos semanas antes del injerto de células tumorales tibiales. La administración de IMC-A12 para probar ratones empezó cuando los niveles de PSA en suero alcanzaron 5-10 ng/ml (que indica tumores establecidos). Se inyectaron 40 mg/kg de IMC-A12 i.p. tres veces a la semana durante seis semanas.

- La densidad mineral ósea (DMO) de las tibias con tumor y las tibias contralaterales sin tumor se midió por absorciometría de rayos X dual (densitómetro PIXImus Lunar) realizada en un área de 2,5 mm x 2,5 mm en el sitio de inyección de células tumorales, o el sitio correspondiente de la tibia contralateral en el momento del injerto. La evaluación cada dos semanas de lesiones se hizo por medidas de PSA en suero. Todos los animales se sacrificaron cuando las lesiones óseas en el grupo de control habían vuelto a ocurrir después de la castración basándose en niveles de PSA en suero (LuCaP 35 >60 ng/ml, ng/ml, LuCaP 23.1 >500 ng/ml), aspecto radiográfico de las lesiones óseas o cuando los animales se comprometieron. Una hora antes de sacrificar los animales se inyectaron con BrdU para monitorizar la proliferación de células tumorales. Las radiografías se tomaron antes del sacrificio (FaxitronX-ray MX-20), y se midieron la DMO de ambas tibias en el momento del sacrificio.

Tratamiento	A12		Control	
	Pata con tumor	Pata sin tumor	Pata con tumor	Pata sin tumor
Media	0,060	0,045	0,098	0,053
Valor de p en comparación con tumor de control	0,0057			
Valor de p en comparación con pata sin tumor	0,0004		0,0049	

Los niveles de PSA en suero fueron significativamente menores en ratones tratados con IMC-A12 (Fig. 7), y el aumento en la DMO asociada al crecimiento de tumores metastásicos osteoblásticos también se redujo significativamente (Tabla 5). Las mediciones de DMO de las patas sin tumor indicaron que el tratamiento con IMC-A12 no produjo una pérdida de densidad ósea (osteoporosis). Las radiografías de ratones tratados con IMC-A12 y sin tratar muestran que la progresión tumoral se redujo significativamente o se previno en ratones tratados (Fig. 8).

Combinación de anticuerpo anti-IGF-IR y docetaxel para metástasis óseas. Ratones SCID se castran 2 semanas antes de las inyecciones de tumor tibial. Las metástasis óseas se generan por inyección directa de células LuCaP 23.1 de cáncer de próstata en la tibia de los ratones, dando lugar a lesiones osteoblásticas. Los xenoinjertos expresan IGF-IR. Se miden niveles de PSA en suero cada dos semanas para evaluar el crecimiento tumoral. Cuando los niveles de PSA en suero alcanzan 5-10 ng/ml que indica tumor establecido, los animales se aleatorizan en cuatro grupos.

En dos grupos se inyectan i.p. 40 mg/kg de IMC-A12 tres veces a la semana durante seis semanas, recibiendo un grupo IMC-A12 + docetaxel 20 mg/kg i.p una vez a la semana durante 6 semanas y un segundo grupo IMC-A12 + docetaxel 10 mg i.p. tres veces a la semana durante 6 semanas. Los grupos de control reciben 10 ó 20 mg de docetaxel i.p. sin IMC-A12.

Los animales se monitorizan con medidas de PSA semanales. Después de la terminación del tratamiento, los animales continúan monitorizándose con medidas de PSA semanales hasta que los tumores en los grupos de solo docetaxel muestran recrecimiento tumoral. Como los valores de PSA suben en los grupos de solo docetaxel (no obstante a una menor tasa que en los animales no tratados), los niveles de PSA en los ratones tratados con IMC-A12 + docetaxel se estabilizan, y en algunos animales, empiezan a disminuir. Se observa que las reducciones en niveles de PSA continúan, incluso después de la terminación del tratamiento a las seis semanas.

Como se indica anteriormente, las mediciones de DMO se hacen en el momento del injerto y en el sacrificio, y las radiografías se toman justo antes del sacrificio. Los grupos tratados con IMC-A12 + docetaxel muestran poco o ningún aumento en la DMO, y las radiografías muestran poco o ningún signo de actividad osteoblástica.

Combinación de anticuerpo anti-IGF-IR y docetaxel para metástasis óseas. Trozos de tumor de próstata humano de LuCaP 23.1 (20 a 30 mm³) se digirieron mecánicamente. 2-5 x 10⁵ células LuCaP 23.1 viables se inyectaron en las tibias de ratones SCID de 6 - 8 semanas de edad. Para el estudio se usaron 21 ratones aleatorizados en tres grupos. Después de la inyección tumoral, el PSA en suero se monitorizó semanalmente. El tratamiento empezó cuando el nivel de PSA en suero alcanzó 5-10 ng/ml, una indicación de crecimiento tumoral. El grupo 1 recibió tampón de solución salina de vehículo de control. El grupo 2 recibió 20 mg/kg de docetaxel i.p una vez a la semana durante 4 semanas. El grupo 3 recibió 20 mg/kg de docetaxel una vez a la semana y 40 mg/kg de A12 i.p. tres veces a la semana durante 4 semanas. Para determinar si la respuesta al tratamiento fue osteoblástica u osteolítica, la DMO se midió por barrido Dexa y rayos X de los animales en el punto final de todos los tratamientos.

Docetaxel solo o docetaxel combinado con A12 inhibió significativamente el crecimiento tumoral de LuCaP 23.1 como se refleja por la supresión de niveles de PSA en suero (Fig. 9a), sin diferencia significativa entre los dos tratamientos. Sin embargo, después del cese del tratamiento, el PSA en suero empezó a aumentar en animales que habían sido tratados con docetaxel solo, que indica un recrecimiento del tumor; mientras que la supresión continuada de niveles de PSA en suero se observó en animales que recibieron tratamiento combinado, que indica un periodo prolongado de quiescencia del tumor después del tratamiento. Se mostró que los niveles de PSA en suero se correlacionaron con la densidad ósea (DMO) y tamaños de hueso con tumor radiografiados (Fig. 9b). En la semana cinco, la densidad ósea promedio en los animales de control, tratados con docetaxel 20 y docetaxel 20 combinado con A12, fue 0,112 ± 0,01, 0,09 ± 0,02 y 0,05 ± 0,009 (media ± EEM), respectivamente. Hubo una evidente tendencia hacia una disminución en la densidad ósea con el tratamiento.

Ejemplo 2

Fosforilación de Akt inducida por aspirado de médula ósea. Muestras de médula ósea de donantes masculinos normales (edades 18-45) se suministraron por Cambrex (programa de donantes Poietics™). Las muestras se centrifugaron a 1.500 rpm con el fin de separar las fases solubles y celulares. El sobrenadante se filtró usando filtros de 0,8 µm y 0,22 µm en sucesión. Se administraron 50 µl de aspirado de médula ósea a células en 1 ml de medio (dilución final 1:20).

Para experimentos realizados en presencia de suero, las células se cultivaron en DMEM complementado con 10 % de SBF y 50 µg/ml de gentamicina durante 24 horas antes de la exposición a médula ósea. Para experimentos en ausencia de suero (células privadas), las células se lavaron dos veces con PBS, el medio de crecimiento se sustituyó con DMEM libre de suero y las células se incubaron durante 4 horas antes de la exposición a preparaciones de médula ósea. Cuando se usó, AG-1296, un inhibidor específico de receptores de PDGF (Rice y col., 1999, Amer. J. Path. 155, 213-21), se añadió a cultivos 30 min antes de la exposición a aspirado de médula ósea. Se administraron anticuerpos IMC-3G3 como se describe en los momentos antes del tratamiento como se establece más adelante.

La activación por médula ósea de Akt se detectó en células PC3-ML, que expresan PDGFR α , pero no en células DU-145, que carecen del receptor. En un experimento, para minimizar el efecto de los componentes del suero sobre la activación de Akt, las células se preincubaron durante 4 horas en medio libre de suero. La adición de extractos de médula ósea produjo la robusta fosforilación de Akt en células PC3-ML, pero no en células DU-145 (Fig. 10A). Para evaluar la significancia de la respuesta se realizó un segundo experimento con suero. La robusta estimulación de la fosforilación de Akt en células PC3-ML por aspirado de médula ósea también se observó en presencia de suero (Fig. 10B). Solo se produjo una pequeña respuesta en células DU-145.

Fosforilación de Akt mediada por PDGFR α . Se cree que los osteoblastos y osteoclastos, que secretan tanto PDGF-AA como PDGF-BB, proporcionan estos factores de crecimiento en el medio soluble de médula ósea. Para determinar si la sensibilidad de células PC3-ML a extractos de médula ósea estuvo o no relacionada con la transducción de señales mediante PDGFR α , células PC3-ML se expusieron a aspirado de médula ósea en ausencia o presencia de AG-1296 20 µM. Esta concentración de AG-1296 inhibe completamente la activación de Akt inducida por PDGF-BB (Fig. 11A). AG-1296 inhibió la activación de Akt inducida por aspirado de médula ósea más del 40 % (Fig. 11B y D). Esto indica que la señalización de PDGFR α es responsable de una proporción significativa de activación de Akt inducida por médula ósea.

También se evaluó la contribución directa de PDGF-AA y -BB a la señalización de PDGFR α con respecto a otros componentes de aspirados de médula ósea. Se determinó que las concentraciones de PDGF-AA y -BB en aspirados de médula ósea de tres donantes diferentes osciló de 400 pg/ml a 2 ng/ml. Dada la dilución de 20 veces de los aspirados de médula ósea, las células de prueba estuvieron en realidad expuestas a concentraciones de PDGF-AA y -BB entre 20 y 100 pg/ml. Por consiguiente, células PC3-ML se trataron con 100 pg/ml de cada uno de PDGF-AA y -BB. La fosforilación de Akt fue inferior al 10 % de la obtenida con los aspirados de médula ósea (Fig. 3C y D). Por consiguiente, parece que la activación de la ruta de Akt por señalización de PDGFR α puede implicar ligandos de PDGFR α distintos de PDGF-AA y -BB y/o mecanismos distintos de la activación de PDGFR α por unión directa de un ligando.

Inhibición de la fosforilación de Akt por un anticuerpo anti-PDGFR α . El anticuerpo neutralizante IMC-3G3, que es específico para PDGFR α humano, también se probó para su capacidad para inhibir la fosforilación de Akt en células PC3-ML. Un tiempo de pre-incubación de 30 minutos y una concentración de 20 µg/ml neutralizaron el efecto estimulante de 30 ng/ml de PDGF-BB (Fig. 12A). El tratamiento con el anticuerpo también produjo aproximadamente el 40 % de inhibición de la fosforilación de Akt inducida por la médula ósea (Fig. 12B y C). También se observó que el efecto inhibitorio de IMC-3G3 sobre la fosforilación de Akt dependía de la duración de la preincubación, siendo un tiempo de incubación de 120 minutos significativamente más eficaz (Fig. 12D) que el tiempo de incubación de 30 minutos (Fig. 12B y C). Una posible explicación es que IMC-3G3 induce la internalización de PDGFR α , y que su efecto inhibitorio está relacionado no solo con bloquear la unión a ligando, sino también con la eliminación del receptor de la membrana plasmática.

Ejemplo 3

Aislamiento de anticuerpos anti-PDGFR α humanos. Se generaron anticuerpos monoclonales anti-PDGFR α humanos por una tecnología de hibridomas convencional (Harlow & Lane, ed., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 211-213 (1998), que se incorpora por referencia en el presente documento) usando ratones transgénicos (Medarex Inc., Sunnyvale, CA) que expresan cadenas de inmunoglobulina pesadas gamma y ligeras kappa humanas. Se compró dominio extracelular (DEC) de PDGFR α humano de R&D Systems (Minneapolis, MN). Ratones KM se inmunizaron subcutáneamente (s.c.) con 3×10^7 células endoteliales aórticas porcinas que expresan establemente PDGFR α (PAE Ra). Después de 4 semanas, los ratones se reforzaron s.c. con 50 µg de DEC de PDGFR α en adyuvante completo de Freund más 3×10^7 células PAE Ra administradas i.p. Los ratones se reforzaron

dos veces más, 3 semanas separadas, con 25 µg de DEC de PDGFRα en adyuvante incompleto de Freund.

Se aislaron esplenocitos de ratones con altos títulos de unión a suero y bloqueo y se fusionaron con células de mieloma. Se subclonaron los cultivos de hibridomas que muestran actividad de bloqueo y los anticuerpos de estos hibridomas se purificaron por cromatografía en proteína G.

5 Las IgG se evaluaron para unirse a PDGFRα en un ensayo de unión directo. El DEC de PDGFRα en PBS se inmovilizó sobre una placa de 96 pocillos (100 ng/pocillo). Entonces, las placas se lavaron con PBST (PBS + 0,05 % de Tween 20) y se bloquearon con PBSM (3 % en leche en PBS, 200 µl/pocillo) durante 2 horas a 25 °C. Las IgG diluidas en PBSM se incubaron con el DEC de PDGFRα inmovilizado durante 1 h a 25 °C, y las placas se lavaron con PBST. Un anticuerpo secundario (conjugado de F(ab')₂ de cabra dirigido contra IgG humana-peroxidasa de rábano picante; BioSource International, Camarillo, CA) diluido 1:5.000 en PBSM se añadió durante 1 hora a 25 °C. Después las placas se lavaron con PBST, se añadió un sustrato de TMB-peroxidasa (KPL, Gaithersburg, MD) y la reacción se detuvo con 100 µl de 1 mol/l de H₂SO₄. Las placas se leyeron a 450 nm usando un lector de microplacas (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

15 El bloqueo de PDGF se evaluó usando un ensayo de bloqueo de PDGF en fase sólida (véase Duan y col., 1991, J. Biol. Chem. 266:413-8, que se incorpora por referencia). DEC de PDGFRα se diluyó en PBS y se recubrió sobre placas de microtitulación de 96 pocillos (tiras 1 x 12 Removawell de fondo plano de Immulon 2HB de poliestireno de unión a proteína irradiada; Dynex Technologies, Chantilly, VA). Cada pocillo se recubrió con 60 ng de PDGFRα durante 3 horas a 25 °C en un volumen total de 100 µl. Entonces, las placas se lavaron dos veces y se bloquearon durante la noche a 4 °C con 25 mmol/l de HEPES (pH 7,45), 0,5 % de gelatina, 100 mmol/l de NaCl y 0,1 % de Tween 20. Entonces, las placas se calentaron a 25 °C durante 20 minutos y se lavaron una vez con tampón de unión (25 mmol/l de HEPES (pH 7,45), 0,3 % de gelatina, 100 mmol/l de NaCl, 0,01 % de Tween 20). Se añadieron cincuenta microlitros de IgG a cada pocillo y se incubaron a 25 °C durante 30 minutos. Se diluyó PDGF yodado en tampón de unión y se añadió (50 µl de una disolución 1 nmol/l) a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 2 horas a 25 °C y luego se lavaron cinco veces con tampón de unión. Cada pocillo se contó en un contador gamma. Se hizo un ensayo de bloqueo basado en células como se describe en Heldin y col., 1988, EMBO J. 7, 1387-93.

La cinética de la unión de anticuerpos a PDGFRα se midió usando un instrumento BIAcore 3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ). DEC de PDGFRα se inmovilizó sobre un chip sensor y el anticuerpo se inyectó a diversas concentraciones. Se obtuvieron sensogramas a cada concentración y se evaluaron usando el programa BIA Evaluation 2.0 para determinar las constantes de velocidad. La constante de afinidad, K_d , se calculó a partir de la relación de las constantes de velocidad K_{dis}/K_{as} .

La Fig. 13 muestra la unión dependiente de la dosis del anticuerpo monoclonal humano IMC-3G3 a DEC de PDGFRα inmovilizado en el ELISA. La concentración de anticuerpo requerida para la máxima unión del 50 % a DEC de PDGFRα fue 0,06 nmol/l (Tabla 6). La DE₅₀ está de acuerdo con la K_d para el anticuerpo como se ha determinado por resonancia de plasmones superficiales en un instrumento BIAcore (Tabla 1). El anticuerpo monoclonal también bloqueo la unión de [¹²⁵I]PDGF-BB a receptor inmovilizado, con una CI₅₀ de 0,43 nmol/l. Los sitios de unión para PDGF-AA y PDGF-BB sobre PDGFRα no son estructuralmente coincidentes. Los datos sugieren que el epítipo para 3G3 solapa espacialmente ambos sitios de unión del factor de crecimiento.

Tabla 6 - Características de unión de anticuerpo anti-PDGFRα

Unión de PDGFRα	Bloqueo de PDGF		Cinética de unión		
(ED ₅₀ , nmol/l)	Fase sólida (CI ₅₀ , nmol/l)	Basado en células (CI ₅₀ , nmol/l)	K_{as} (10 ⁵ mol/l ⁻¹ s ⁻¹)	K_{dis} (10 ⁻⁴ s ⁻¹)	K_d (10 ⁻⁹ mol/l)
0,06	0,24	0,58	11,50	0,47	0,04

40 **Inhibición de la fosforilación de receptor y activación de moléculas efectoras aguas abajo.** Los efectos sobre la señalización intracelular inducida por PDGF por IMC-3G3 se determinaron usando células PAE Rα. Las células se sembraron en placas de cultivo de tejido Falcon de seis pocillos (250.000 células por pocillo) y se dejaron crecer durante la noche. Entonces, los pocillos se aclararon y se incubaron en medio sin suero. Después de una incubación durante la noche para convertir las células en quiescentes, las células se trataron con anticuerpos durante 30 minutos a 37 °C, seguido de la adición de PDGF-AA o PDGF-BB e incubación durante 10 minutos adicionales a 37 °C. Entonces, las células se desprendieron y se lisaron en 200 µl de tampón de lisis (50 mmol/l de Tris-HCl (pH 8,0), 1 % de Triton X-100, 150 mmol/l de NaCl, 1 mmol/l de EDTA, 0,1 % de SDS, 1 mmol/l de ortovanadato de sodio e inhibidores de proteasa (Complete Mini, Roche, Mannheim, Alemania)). Los lisados celulares se analizaron por SDS-PAGE y transferencia Western usando reactivos de quimioluminiscencia potenciados e Hyperfilm (Amersham Biosciences).

Se probó para la capacidad del anticuerpo para inhibir la fosforilación de tirosina de receptor inducida por ligando. PDGF-AA y PDGF-BB aumentan la fosforilación de tirosina de PDGFR α aproximadamente 5 veces a concentraciones de 1 y 3 nmol/l, respectivamente. Mayores concentraciones de ligando (10 nmol/l) produjeron receptor menos fosforilado posiblemente debido a la degradación inducida por ligando. El anticuerpo inhibió el receptor inducido por PDGF-BB a niveles próximos al ruido de fondo (Fig. 14A, fila superior). Se obtuvieron datos similares usando PDGF-AA para inducir la fosforilación de receptores.

Los PDGF transducen señales mitogénicas y ejercen efectos antiapoptóticos sobre células que expresan receptor mediante proteína efectora aguas abajo. Por consiguiente, el anticuerpo monoclonal se probó para su capacidad para inhibir la activación de MAPK p44/p42 y Akt (implicado en el crecimiento celular y rutas antiapoptóticas, respectivamente). El anticuerpo anti-PDGFR α inhibió la fosforilación de tanto MAPK como Akt en respuesta a PDGF-BB (Fig. 2A) y PDGF-AA (no mostrado). La inhibición de la fosforilación de PDGFR α fue dependiente de la dosis, con 50 % de inhibición alcanzada a 0,25 nmol/l (Fig. 14B).

Actividad antimitogénica. El anticuerpo monoclonal anti-PDGFR α se probó para su capacidad para bloquear mitogénesis inducida por PDGF-AA de células PAE R α . Las células se sembraron en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos (1 x 10⁴ células por pocillo) y se cultivaron durante la noche en 100 μ l de medio por pocillo. Entonces, los pocillos se aclararon con medio sin suero y las células se privaron de suero durante la noche con 75 μ l de medio sin suero añadido a cada pocillo. Se añadió IgG (25 μ l/pocillo) y las placas se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Entonces se añadió PDGF-AA o PDGF-BB (25 μ l/pocillo) y las placas se incubaron durante 18 a 20 horas a 37 °C. Las placas se incubaron durante 4 horas adicionales después de que cada pocillo recibiera 0,25 μ Ci de [³H]timidina (25 μ l/pocillo). El anticuerpo, PDGF y [³H]timidina se diluyeron todos en medio sin suero. Entonces, las células se lavaron con PBS más 1 % de albúmina de suero bovino y se desprendieron mediante tratamiento con tripsina (100 μ l/pocillo). Las células se recogieron sobre un filtro y se lavaron tres veces con agua doblemente destilada usando un recolector de células MACH III (Tomtec, Inc., Hamden, CT). Después de procesar el filtro, la radiactividad incorporada en el ADN se determinó en un contador de centelleo (Paredac Microbeta, modelo 1450).

Cuando IMC-3G3 se añadió a células PAE R α privadas de suero, la incorporación de timidina inducida por PDGF-AA se inhibió específicamente (Fig. 15) con una CE₅₀ de 8,3 nmol/l. El anticuerpo también inhibió la mitogénesis inducida por 3 nmol/l de PDGF-BB de células PAE R α con una CE₅₀ de 1,25 nmol/l (datos no mostrados).

Inhibición del crecimiento de líneas celulares tumorales humanas que expresa PDGFR α . Se probaron líneas celulares tumorales humanas que expresan PDGFR α para determinar los efectos del anticuerpo anti-PDGFR α humano sobre el crecimiento maligno en sistemas *in vitro* e *in vivo*. Dos de tales líneas celulares tumorales que expresan PDGFR α como se ha determinado por citometría de flujo son SKLMS-1 (leiomiocarcinoma) y U118 (glioblastoma). Estas líneas celulares también responden a ligando en ensayos mitogénicos y forman tumores en ratones. SKLMS-1 tiene las posibilidades de no solo estimulación paracrina, sino también autocrina. Se mostró que SKLMS-1 expresaba proteína PDGF-AA cuando se cultivó en cultivo usando una técnica de inmunoensayo enzimático de sándwich cuantitativa (R&D Systems).

Como puede apreciarse en la Fig. 16A, IMC-3G3 inhibió la fosforilación de tanto Akt como MAPK en respuesta a estimulación de PDGF-AA de células SKLMS-1. La inhibición de la fosforilación de Akt fue del 100 % y la de MAPK fue de aproximadamente el 80 %. El anticuerpo también es un inhibidor eficaz de la fosforilación en células U118 (Fig. 16B). También se bloqueó la mitogénesis inducida por ligando de células tumorales. Cuando el anticuerpo anti-PDGFR α se añadió a células U118 privadas de suero, la incorporación de timidina inducida por PDGF-AA se inhibió específicamente (Fig. 17A) con una CE₅₀ de 3,4 nmol/l. El anticuerpo también inhibió la respuesta mitogénica inducida por PDGF-AA de células SKLMS-1 con una CE₅₀ de 5 nmol/l (Fig. 17B), además de la respuesta mitogénica estimulada por PDGF-BB (Fig. 17C). Solo se observó inhibición parcial (40 % a 66 nmol/l; Fig. 17D) de la respuesta mitogénica estimulada por PDGF-BB para células U118. Esto se atribuye a la expresión de tanto PDGFR α como PDGFR β en aquellas células (datos no mostrados).

Inhibición del crecimiento de xenoinjerto de tumor. IMC-3G3 se probó *in vivo* en modelos de xenoinjerto de glioblastoma (U118) y leiomiocarcinoma (SKLMS-1) subcutáneo (s.c.) en ratones sin pelo atímicos. Los xenoinjertos de tumor s.c. se establecieron inyectando 10 x 10⁶ células SKLMS-1 o U118 mezcladas en Matrigel (Collaborative Research Biochemicals, Bedford, MA) en ratones sin pelo atímicos femeninos (CrI:NU/NU-nuBR, Charles River Laboratories, Wilmington, MA). Se dejó que los tumores alcanzaran un volumen del tumor medio ($\pi / 6 \times$ longitud más larga x anchura perpendicular²) de aproximadamente 400 mm³. Los ratones se aleatorizaron en cinco grupos (n = 12) y se trataron por inyección i.p. dos veces a la semana durante la duración del estudio. Los ratones del grupo 1 se trataron con control de vehículo (0,9 % de NaCl, USP para irrigación, B/Braun). Los ratones de los grupos 2 a 4 se trataron con 6, 20 y 60 mg/kg del presente anticuerpo anti-PDGFR α . Los ratones del grupo 5 se trataron con 60 mg/kg de IgG humana (Sigma). Los grupos tratados con 6, 20 ó 60 mg/kg de anticuerpo anti-PDGFR α o IgG humana se administraron con 21,4, 71,4 y 214 mg/kg de dosis de carga, respectivamente. Las dosis de carga se calcularon para lograr una concentración en plasma en estado estacionario de la primera dosis (semivida de eliminación, 7 días)

usando una pauta de dosificación de dos veces a la semana. Los volúmenes de tumor se evaluaron dos veces a la semana y el crecimiento tumoral en los grupos de tratamiento se comparó con un ANOVA de medidas repetidas.

5 Como se muestra en la Fig. 18A, la IgG humana no tuvo efecto sobre el crecimiento de glioblastoma en comparación con ratones tratados con solución salina ($P = 0,74$), mientras que el anticuerpo anti-PDGFR α inhibió significativamente el crecimiento tumoral a dosis de 6 ($P = 0,06$), 20 ($P = 0,03$) y 60 ($P = 0,0004$) mg/kg. Al final del estudio de U118, los valores de % de T/C [(volumen del tumor promedio para el grupo tratado con 3G3 al finalizar el estudio / volumen del tumor promedio al inicio del tratamiento) / (volumen del tumor promedio para grupo tratado con control al finalizar el estudio / volumen del tumor promedio al inicio del tratamiento) x 100] fueron 67 %, 63 % y 35 % durante 6, 20 y 60 mg/kg de grupos de dosis tratados con 3G3, respectivamente. Además, se observó regresión tumoral en 4 de 12, 5 de 10 y 10 de 12 animales en los grupos de tratamiento de 6, 20 y 60 mg/kg. No hubo regresiones en ningún grupo de control.

La Fig. 18B muestra que el crecimiento de leiomiomas también se inhibió significativamente mediante tratamiento a 6 ($P = 0,02$), 20 ($P = 0,003$) y 60 ($P < 0,0001$) mg/kg. Los valores de % de T/C finales fueron 66 %, 57 % y 31 % para los grupos de tratamiento de 6, 20 y 60 mg/kg, respectivamente, sin regresiones tumorales.

15 El examen histológico de xenoinjertos al final del tratamiento mostró marcadas diferencias en tumores de animales tratados en comparación con tumores de animales que recibieron terapia de control. Los tumores reseccionados se fijaron en fijador QDL a 4 °C durante 24 horas. Después de incorporarlos en parafina y seccionar a 4 μ m, las secciones fijadas en formalina se tiñeron con Mayer's H&E (Richard Allen, Kalamazoo, MI).

20 En el grupo de U118 tratado con la mayor dosis (60 mg/kg) se encontraron menos células tumorales viables y hubo sustancialmente más regiones escasas de células en comparación con el grupo de control de solución salina (Fig. 18C). Los xenoinjertos de SKLMS-1 tratados en el día 25 también mostraron una reducción en la cantidad de células tumorales viables y empaquetamiento celular en comparación con el grupo de control de solución salina (Fig. 18D).

Inhibición *in vitro* de la estimulación mediada por PDGFR α de una línea de glioblastoma. El nivel de fosfotirosina de receptor en tumores U118 se evaluó una semana después del tratamiento con anticuerpo anti-PDGFR α o IgG humana. Ratones con tumores U118 establecidos (500 mm³) se trataron con una dosis de carga de 214 mg/kg seguido 72 horas después por una dosis de mantenimiento de 60 mg/kg de anticuerpo. Los tumores se recogieron de ratones una semana (168 horas) después de la primera inyección de anticuerpo (en un momento antes que se observara la regresión tumoral en promedio; véase la Fig. 18A) y se homogeneizaron en tampón de lisis de ensayo de fosforilación (véase anteriormente). Los lisados se centrifugaron dos veces a 14.000 rpm y se determinó la concentración de proteína para el sobrenadante recogido (ensayo de proteínas Bio-Rad, Bio-Rad, Hercules, CA). El lisado (4 mg) de cada muestra se inmunoprecipitó usando anticuerpo anti-PDGFR α . Entonces, PDGFR α humano inmunoprecipitado se inmunotransfirió con tanto un anticuerpo anti-PDGFR como anti-fosfotirosina. La Fig. 19 muestra que la administración de anticuerpo anti-PDGFR α produjo reducción en el nivel de fosfotirosina de PDGFR α con respecto a un control de IgG humana en estos tumores.

35 **Ingeniería de la línea celular.** Primero, los genes que codifican los dominios variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-PDGFR α humano se clonaron y se secuenciaron. Se obtuvo una primera serie de MEDAREX que se hibridó con las secuencias flanqueantes de 5' y 3' de las secuencias de inmunoglobulina humana de la región variable dentro de hibridomas derivados de MEDAREX. La región variable de la cadena pesada se amplificó con el par de cebadores AB88 (directo) y AB90 (inverso) (Tabla 7). Los productos de la cadena ligera se amplificaron con pares de cebadores que contienen el cebador directo AB182 y el cebador inverso AB16 (Tabla 7). Los productos de 0,4 kb de estas reacciones se clonaron en el vector ZeroBlunt (Invitrogen) para producir AB88-1 (V_H) y AB 182-3 (V_k), y los insertos se secuenciaron con cebadores T7 y M13R universales.

Tabla 7 - Cebadores para hibridomas MEDAREX			
Oligo	Tamaño	Secuencia de ADN (5'-3')	SEC ID N°
AB88	21	ATGAAACACCTGTGGTTCTTC	20
AB90	21	TGCCAGGGGGAAGACCGATGG	21
AB182	24	ATGGAA(G/A)CCCCAGCGCAGCTTCTC	22
AB16	20	CGGGAAGATGAAGACAGATG	23

45 Con el fin de generar vectores de plásmido para expresar el anticuerpo IgG1 completo, las regiones variables clonadas se amplificaron por PCR y se ligaron en dos etapas en vectores de expresión que contenían genes de la región

5 constante. La amplificación de la cadena pesada por PCR primaria utilizó 25 ng de plásmido AB88-1 como molde para cebadores IPHF5 (directo) e IPHR5 (inverso). La amplificación de la cadena pesada por PCR secundaria utilizó 5 µl de reacción primaria como molde y los cebadores OPSIF y IPHR5. La combinación de los dos cebadores directos añade una secuencia de 57 pares de bases al extremo 5' de los genes de inmunoglobulina que codifican una secuencia señal del gen de la cadena pesada de ratón de 19 aminoácidos (MGWSCILFLVATATGVHS; SEC ID N°: 24) para el eficaz procesamiento y secreción de inmunoglobulina. Además, el cebador directo OPSIF añade una secuencia de "Kozak" consenso (*J. Mol. Biol.* **196**:947) para la eficaz iniciación de la traducción de estos genes en células de mamífero y un sitio de endonucleasa de restricción 5' HindIII para clonar el producto amplificado en el vector de expresión adecuado. El cebador inverso de la cadena pesada contiene un sitio NheI en marco para clonar en el vector de la región constante.

10 La PCR se realizó en dos etapas utilizando el kit de PCR Expand (Boehringer Mannheim Inc.) según especificaciones del fabricante usando el sistema de tampón Expand n° 3 en reacciones de 50 µl con las siguientes condiciones de ciclado:

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

15 Después de dos rondas de PCR, el producto se purificó siguiendo electroforesis en gel de agarosa y se clonó como un fragmento digerido con HindIII-NheI en vector pDFc (Fig. 8), que contenía la región constante gamma 1 humana.

20 La amplificación de la cadena ligera por PCR primaria utilizó 25 ng de plásmido pAB182-3 como cebadores de molde IPLF4 (directo) e IPLR2 (inverso). La amplificación de la cadena ligera por PCR secundaria utilizó 5 µl de reacción primaria como molde y los cebadores OPSIF e IPLR2. Al igual que para la cadena pesada, los dos cebadores directos proporcionan una secuencia señal de la secreción. El cebador inverso de la cadena ligera contiene un sitio BsiWI en marco para clonación en el vector de la región constante kappa pLck (Fig. 8). Las reacciones de PCR se realizaron como para la cadena pesada anteriormente. Después de dos rondas de PCR, el producto se purificó siguiendo electroforesis en gel de agarosa y se clonó en pLck, que contiene la región constante kappa humana de la cadena ligera.

Tabla 8 - Cebadores para vectores de expresión de V_H y V_K

Oligo	Tamaño	secuencia de ADN (5'-3')	SEC ID N°
OPSIF	53	GAGAAGCTTGCCGCCACCATGGGATGGTCATGTATCAT CCTTTTCTAGTAGC	25
IPHF5	58	TCCTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTCA CAGCTGCAGCTGCAGGAGTC	26
IPHR5	37	CGCGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCCCTGG	27
IPLF4	58	TCCTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTCCAG AAATTGTGTTGACACAGTC	28
IPLR2	37	GCGCGTACGTTTGATTTCCACCTTGGTCCCTTGGCCG	29

25 Con el fin de generar un único vector de plásmido para transfección estable, el casete de expresión de la cadena pesada, que contiene un promotor del CMV, región codificante de la cadena pesada y elemento poliA se clonaron en el vector de la cadena ligera como un fragmento NotI-Sall (Fig. 20).

Este construcción se utilizó entonces para generar una línea de producción estable en células NS0 de la línea de células de mieloma. Las células NS0 se transfectaron con el plásmido de expresión mediante electroporación usando

BioRad Gene Pulser II. Antes de la transfección, el ADN de plásmido se linealizó con PvuI, se precipitó en etanol y se resuspendió a una concentración de 0,4 mg/ml (40 ug en 100 ul de dH₂O). Las células se electroporaron con 40 ug de ADN en un volumen final de 800 ul por un único pulso de 250 voltios, 400 μFd. Las células electroporadas se dispersaron en alícuotas de 50 ul en medio DMEM (JRH Biosciences Inc.) que contenía 10 % de suero bovino fetal dializado (dFCS) (Hyclone, nº de lote: AHA7675) y glutamina 2 mM (Invitrogen/Life Technologies) en pocillos de aproximadamente dieciocho placas de 96 pocillos a una densidad de 5.000 -10.000 células por pocillo. La selección de transfectantes positivos para glutamina sintetasa (GS) se inició 24 horas después de la adición de DMEM sin glutamina que contenía 10 % de dFCS y complementado con 1x suplemento GS (JRH Biosciences Inc.). Las células se cultivaron durante 2-4 semanas a 37 °C, 5 % de CO₂ para permitir el crecimiento y expansión de colonias. Más de 300 colonias se cribaron usando un ELISA anti-Fc humano (gamma) (detección de peroxidasa de rábano picante a A450 nm). Los clones que expresan anticuerpo (58 %) se expandieron y se volvieron a probar para productividad durante 3-5 días de cultivo. Para adaptar las células en medio sin suero, las líneas celulares positivas se expandieron mediante la adición de un volumen igual de medio de cultivo GS-0S sin suero en cada pase. Positivos fuertes, que producen 25 ug/ml o más en cultivos en 24 pocillos subconfluentes de 3 días, se expandieron para el posterior análisis para completar la adaptación a medio sin suero.

Otras realizaciones incluyen:

(a) Tratamientos con antagonistas de IGF-IR

Un procedimiento para tratar un sujeto que tiene un tumor óseo, que comprende administrar una cantidad eficaz de un antagonista de IGF-IR.

Un procedimiento para inhibir crecimiento de un tumor óseo, que comprende administrar una cantidad eficaz de un antagonista de IGF-IR.

El tumor óseo según estos procedimientos pueden ser un tumor primario o secundario.

El crecimiento de células tumorales puede ser dependiente de andrógenos o independiente de andrógenos.

El tumor puede metastatizarse de un cáncer de próstata, un cáncer de mama o un cáncer de pulmón.

Los antagonistas pueden coadministrarse con un segundo antagonista de tirosina cinasa de receptor.

Los antagonistas pueden coadministrarse con una cantidad eficaz de un agente antineoplásico. El agente antineoplásico puede ser docetaxel, doxorubicina o radiación.

El antagonista de IGF-IR puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Tal anticuerpo o fragmentos de anticuerpos pueden competir para unirse a IGF-IR con un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene SEC ID Nº: 41 y un dominio variable de la cadena ligera que tiene SEC ID Nº: 51. Alternativamente, el antagonista de IGF-IR puede ser un inhibidor intracelular de IGF-IR y puede seleccionarse del grupo que consiste en AG1024, NVP-AEW541 y BMS-554417.

El antagonista de IGF-IR puede inhibir la unión de IGF-I o IGF-II a IGF-IR, neutralizar la activación de IGF-IR por IGF-I o IGF-II, reducir la concentración de receptor de la superficie de IGF-IR o inhibir la fosforilación de una molécula de señalización en la dirección 3' de IFG-IR.

El antagonista de IGF-IR puede ser un anticuerpo que se une a IGF-IR con una K_d de aproximadamente 3 x 10⁻¹⁰ M⁻¹ o menos.

El antagonista de IGF-IR puede ser un anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico puede ser específico para IGF-IR y PDGFR α ; o IGF-IR y EGFR.

(b) Anticuerpos para PDGFR α

Un anticuerpo humano aislado o fragmento de anticuerpo específico para PDGFR α que comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID Nº: 2 en CDRH1; SEC ID Nº: 4 en CDRH2; SEC ID Nº: 6 en CDRH3; SEC ID Nº: 10 en CDRL1; SEC ID Nº: 12 en CDRL2; y SEC ID Nº: 14 en CDRL3.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende preferentemente:

(a) SEC ID Nº: 2 en CDRH1; SEC ID Nº: 4 en CDRH2; y SEC ID Nº: 6 en CDRH3; o

(b) SEC ID Nº: 10 en CDRL1; SEC ID Nº: 12 en CDRL2; y SEC ID Nº: 14 en CDRL3.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende más preferentemente SEC ID N°: 2 en CDRH1; SEC ID N°: 4 en CDRH2; SEC ID N°: 6 en CDRH3; SEC ID N°: 10 en CDRL1; SEC ID N°: 12 en CDRL2; y SEC ID N°: 14 en CDRL3.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender SEC ID N°: 8 o SEC ID N°: 16 y más preferentemente comprende SEC ID N°: 8 y SEC ID N°: 16.

5 El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede:

- (a) unirse selectivamente a PDGFR α ;
- (b) inhibir la unión de PDGFR α a un ligando de PDGFR α ; o
- (c) neutralizar PDGFR α .

10 El fragmento de anticuerpo puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo monocatenario, un Fab, un Fv monocatenario, un díacuerpo y un triacuerpo.

Otra realización de la invención se refiere a un conjugado del anticuerpo o fragmento de anticuerpo tratado anteriormente. El conjugado puede comprender un agente antineoplásico, un resto diana o un resto indicador.

15 Otra realización de la invención se refiere a polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo y comprende una o más secuencias de nucleótidos seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID N°: 1 en CDRH1; SEC ID N°: 3 en CDRH2; SEC ID N°: 5 en CDRH3; SEC ID N°: 9 en CDRL1; SEC ID N°: 11 en CDRL2; y SEC ID N°: 13 en CDRL3.

El polinucleótido aislado puede comprender SEC ID N°: 7 o SEC ID N°: 15.

Otra realización de la invención se refiere a un vector de expresión que comprende el polinucleótido.

20 Otra realización de la invención se refiere a una célula huésped recombinante que comprende el vector de expresión. La célula huésped recombinante puede producir:

- (a) un polipéptido que comprende SEC ID N°: 8 y un polipéptido que comprende SEC ID N°: 16; o
- (b) un polipéptido que comprende SEC ID N°: 8 y SEC ID N°: 16.

Otra realización de la invención se refiere a una cantidad eficaz del anticuerpo descrito anteriormente para su uso como un medicamento para neutralizar la activación de PDGFR α en un mamífero.

25 Otra realización adicional de la invención se refiere a una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo descrito anteriormente para su uso como medicamento para inhibir el crecimiento tumoral en un mamífero. Preferentemente, el anticuerpo se usa para inhibir el crecimiento de un tumor que expresa o expresa en exceso PDGFR α . El tumor es preferentemente un tumor primario, un tumor metastásico, un tumor resistente al tratamiento o un tumor vascularizado. Además, el tumor puede seleccionarse del grupo que consiste en un tumor de ovario, un tumor de mama, un tumor de pulmón, un tumor hepatocelular, un tumor del estroma gastrointestinal, un melanoma, un carcinoma de células renales, un tumor de próstata y un sarcoma de tejido blando.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede administrarse en combinación con un agente antineoplásico. El agente antineoplásico es preferentemente un agente quimioterapéutico. El agente antineoplásico puede también ser preferentemente doxorubicina o radiación.

35 El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede administrarse con un segundo antagonista de PDGFR α . El antagonista de PDGFR α es preferentemente un antagonista de PDGFR α intracelular.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede administrarse con una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de receptor de factor de crecimiento epitelial (EGFR) o una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de factor de crecimiento receptor similar a insulina (IGF-IR).

40 **Listado de secuencias**

<110> Imclone Systems Incorporated y col.

<120> Antagonistas de receptores para el tratamiento de cáncer de huesos metastásico

<130> 11245/54076

<140> Por asignar

<141> 19/06/2006

5

<150> 60/691.920

<151> 17/06/2005

<160> 63

10

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 15

15

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

20

<222> (1)..(15)

<400> 1

agc agt agt tac tac
Ser Ser Ser Tyr Tyr
1 5

15

25

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 2

Ser Ser Ser Tyr Tyr
1 5

ES 2 452 115 T3

<210> 3

<211> 48

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(48)

10

<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

15

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

20

```
      Ser Phe Phe Tyr Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser
      1          5          10          15
```

<210> 5

<211> 51

25

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

30

<222> (1)..(51)

<400> 5

ES 2 452 115 T3

```

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

5 <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

```

10

<210> 7

<211> 381

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(381)

20

<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

```

ES 2 452 115 T3

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

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

10

<210> 9

<211> 33

<212> ADN

15

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(33)

ES 2 452 115 T3

<400> 9

```
agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac tta gcc      33
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1          5          10
```

5 <210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 10

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

<210> 11

15 <211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

20 <221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 11

```
gat gca tcc aac agg gcc act      21
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1          5
```

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 12

ES 2 452 115 T3

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

5 <210> 13
<211> 27
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
10 <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

15 <210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 14

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Ala
1 5

25 <210> 15
<211> 321
<212> ADN
<213> Homo sapiens

30 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)

<400> 15

ES 2 452 115 T3

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

5 <211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

10

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

15 <211> 15

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> péptido sintético

5

<400> 17

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

10

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Desconocido

15

<220>

<223> péptido sintético

<400> 18

20

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

25

<213> Desconocido

<220>

<223> péptido sintético

30

<400> 19

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 20

ES 2 452 115 T3

<211> 21
<212> ADN
<213> artificial

5 <220>
<223> cebador sintético

<400> 20
atgaaacacc tgggttctt c 21

10 <210> 21
<211> 21
<212> ADN
<213> artificial

15 <220>
<223> cebador sintético

<400> 21
20 tgccaggggg aagaccgatg g 21

<210> 22
<211> 24
<212> ADN
25 <213> artificial

<220>
<223> cebador sintético

30 <400> 22
atggaarccc cagcgagct tctc 24

<210> 23
<211> 20
35 <212> ADN

ES 2 452 115 T3

<213> artificial

<220>

<223> cebador sintético

5

<400> 23

cgggaagatg aagacagatg 20

<210> 24

10

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

15

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

20

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> cebador sintético

25

<400> 25

gagaagcttg ccgccacat gggatggca tgtatcatcc ttttctagt agc 53

<210> 26

30

<211> 58

<212> ADN

<213> artificial

<220>

ES 2 452 115 T3

<223> cebador sintético

<400> 26

tccttttct agtagcaact gcaactggag tacattcaca gctgcagctg caggagtc 58

5

<210> 27

<211> 37

<212> ADN

<213> artificial

10

<220>

<223> sintético

<400> 27

15 cgcgctagct gaggagacgg tgaccagggt tcctgg 37

<210> 28

<211> 58

<212> ADN

20

<213> artificial

<220>

<223> cebador sintético

25

<400> 28

tccttttct agtagcaact gcaactggag tacattcaga aattgtgtg acacagtc 58

<210> 29

<211> 37

30

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> cebador sintético

35

ES 2 452 115 T3

<400> 29

gcgcgtacgt ttgattcca ccttggtccc ttggccg 37

<210> 30

5 <211> 1431

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

10 <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	
15	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	

ES 2 452 115 T3

										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	
										145											150											155	
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	
										225											230											235	
gac	aag	aga	ggt	gag	ccc	aaa	tct	tgt	gac	aaa	act	cac	aca	tgc	cca	768	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	
										245											250											255	
ccg	tgc	cca	gca	cct	gaa	ctc	ctg	ggg	gga	ccg	tca	gtc	ttc	ctc	ttc	816	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	
										260											265											270	
ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	acc	ctc	atg	atc	tcc	cgg	acc	cct	gag	gtc	864	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	
										275											280											285	
aca	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cac	gaa	gac	cct	gag	gtc	aag	ttc	912	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	
										290											295											300	
aac	tgg	tac	gtg	gac	ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	aag	aca	aag	ccg	960	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	
										305											310											315	
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	

ES 2 452 115 T3

355	360	365	
aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg 370 375 380			1152
gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly 385 390 395 400			1200
ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro 405 410 415			1248
gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser 420 425 430			1296
ttc ttc ctc tat agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln 435 440 445			1344
ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His 450 455 460			1392
tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tcc ccg ggt aaa tga Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 465 470 475			1431

<210> 31

<211> 476

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

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

10

ES 2 452 115 T3

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

ES 2 452 115 T3

<210> 32

<211> 702

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(702)

10

<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	

ES 2 452 115 T3

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

5

<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

10

ES 2 452 115 T3

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

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(15)

<400> 34

agc tat gct atc agc
 Ser Tyr Ala Ile Ser
 1 5

15

15

<210> 35

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 35

Ser Tyr Ala Ile Ser
 1 5

25

<210> 36

ES 2 452 115 T3

<211> 51

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5

<220> .

<221> CDS

<222> (1)..(51)

<400> 36

10

```

ggg atc atc cct atc ttt ggt aca gca aac tac gca cag aag ttc cag      48
Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1           5           10           15
ggc                                           51
                                Gly

```

<210> 37

15

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

20

```

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

25

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

30

<222> (1)..(63)

<400> 38

ES 2 452 115 T3

```

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

5 <211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

10

```

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

15 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

20 <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 . . . . .

```


ES 2 452 115 T3

tcg gtg 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

5

<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

10

ES 2 452 115 T3

<210> 42

<211> 1440

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1440)

10

<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 80	
cag aag ttc cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aaa tcc acg agc	288
Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser	
85 90 95	
aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
100 105 110	
tat tac tgt gcg aga gcg cca tta cga ttt ttg gag tgg tcc acc caa	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Leu Arg Phe Leu Glu Trp Ser Thr Gln	
115 120 125	
gac cac tac tac tac tac atg gac gtc tgg ggc aaa ggg acc acg	432
Asp His Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr	
130 135 140	
gtc acc gtc tca agc gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg	480
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu	
145 150 155 160	
gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc	528
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys	
165 170 175	
ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tct ggg aac tca	576
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser	
180 185 190	

ES 2 452 115 T3

ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser	624
tca gga ctc tac tcc ctg agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser	672
ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn	720
acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His	768
aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val	816
ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr	864
cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu	912
gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys	960
aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser	1008
gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys	1056
tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile	1104
tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro	1152
cca tcc ccg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu	1200
gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn	1248
ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser	1296
gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg	1344
tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu	1392
cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	1440

<210> 43

5

<211> 479

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 452 115 T3

<400> 43

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe
 35 40 45

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

Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Leu Arg Phe Leu Glu Trp Ser Thr Gln
 115 120 125

Asp His Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr
 130 135 140

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

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 165 170 175

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 180 185 190

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 195 200 205

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 210 215 220

ES 2 452 115 T3

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

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(33)

ES 2 452 115 T3

<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
```

5 <210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 45

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

<210> 46

15 <211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

20 <221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 46

```
ggg gaa aat aag cgg ccc tca      21  
Gly Glu Asn Lys Arg Pro Ser  
1           5
```

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400> 47

ES 2 452 115 T3

Gly Glu Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 48
<211> 33
5 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
10 <222> (1)..(33)

<400> 48

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

15 <210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <400> 49

Lys Ser Arg Asp Gly Ser Gly Gln His Leu Val
1 5 10

25 <210> 50
<211> 327
<212> ADN
<213> Homo sapiens

30 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(327)

<400> 50

ES 2 452 115 T3

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	
				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

5

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

10

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
				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

15

<211> 702

<212> ADN

ES 2 452 115 T3

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

5

<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

ggg 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 200 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

```

10

<210> 53

ES 2 452 115 T3

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<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

10

<210> 54

<211> 33

<212> ADN

ES 2 452 115 T3

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

5 <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
```

10

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 55

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

20

<210> 56

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

25

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 56

30

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

<210> 57

ES 2 452 115 T3

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 57

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 58

10 <211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

15 <221> CDS

<222> (1)..(33)

<400> 58

20 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

25 <213> Homo sapiens

<400> 59

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

<210> 60

<211> 327

<212> ADN

<213> Homo sapiens

ES 2 452 115 T3

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(327)

5 <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	

10 <210> 61

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 61

ES 2 452 115 T3

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

5

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

10

<222> (1)..(702)

<400> 62

atg gga tgg tca tgt atc atc ctt ttt cta gta gca act gca act gga 48
 1 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly 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 25 Asp Pro Ala Val Ser Val Ala 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 45
 tat tat gca agc tgg tac cag cag aag cca gga cag gcc cct gta ctt 192
 Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr 55 Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu 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

ES 2 452 115 T3

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	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								
					230											

<210> 63

<211> 233

5

<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

10

ES 2 452 115 T3

Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 85 90 95
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Asn Ser
 100 105 110
 Asp Asn Arg Leu Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser
 115 120 125
 Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 130 135 140
 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 145 150 155 160
 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 165 170 175
 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 180 185 190
 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 195 200 205
 His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
 210 215 220
 Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser
 225 230

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista de PDGFR α , en el que dicho antagonista de PDGFR α es un anticuerpo o fragmento del mismo que es específico para PDGFR α humano y que comprende SSSYY (SEC ID N°: 2) en CDRH1; SFFYTGSTYYNPSLRS (SEC ID N°: 4) en CDRH2; QSTYYYYGSGNYYGWFDR (SEC ID N°: 6) en CDRH3; RASQSVSSYLA (SEC ID N°: 10) en CDRL1; DASNRAT (SEC ID N°: 12) en CDRL2; y QQRSNWPPA (SEC ID N°: 14) en CDRL3, para su uso en el tratamiento de cáncer de huesos metastásico en un sujeto.

2. El antagonista de PDGFR α para su uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene

QLQLQESGPGLVKPKSETLSLTCTVSGGSINSSSYWGWLRQSPGKGLEWIGSFFY
TGSTYYNPSLRSRLTISVDTSKNQFSLMLSSVTAADTAVYYCARQSTYYYYGSGNY YGWFDWRWDQGLTVTVSS (SEC ID N°: 8) o un dominio variable de la cadena ligera que tiene EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPAFGQGTKVEIK (SEC ID N°: 16).

3. El antagonista de PDGFR α para su uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende un dominio variable de la cadena pesada que tiene

QLQLQESGPGLVKPKSETLSLTCTVSGGSINSSSYWGWLRQSPGKGLEWIGSFFY
TGSTYYNPSLRSRLTISVDTSKNQFSLMLSSVTAADTAVYYCARQSTYYYYGSGNY YGWFDWRWDQGLTVTVSS (SEC ID N°: 8) y un dominio variable de la cadena ligera que tiene EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPAFGQGTKVEIK (SEC ID N°: 16).

4. El antagonista de PDGFR α para su uso según la reivindicación 3, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una cadena pesada que tiene

MGWSCIIILFLVATATGVHSQLQLQESGPGLVKPKSETLSLTCTVSGGSINSSSYWGW
WLRQSPGKGLEWIGSFFYTGSTYYNPSLRSRLTISVDTSKNQFSLMLSSVTAADT
AVYYCARQSTYYYYGSGNYYGWFDRWDQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
KDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGN
VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEC ID N°: 31) y una cadena ligera que tiene

MGWSCIIILFLVATATGVHSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ
KQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSN
WPPAFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYAPREKVKQW
KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSLTKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC (SEC ID N°: 33).

5. El antagonista de PDGFR α para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el tumor ha metastatizado de un cáncer de próstata, cáncer de mama o cáncer de pulmón.

6. El antagonista de PDGFR α para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo inhibe la unión de PDGFR α o neutraliza PDGFR α .

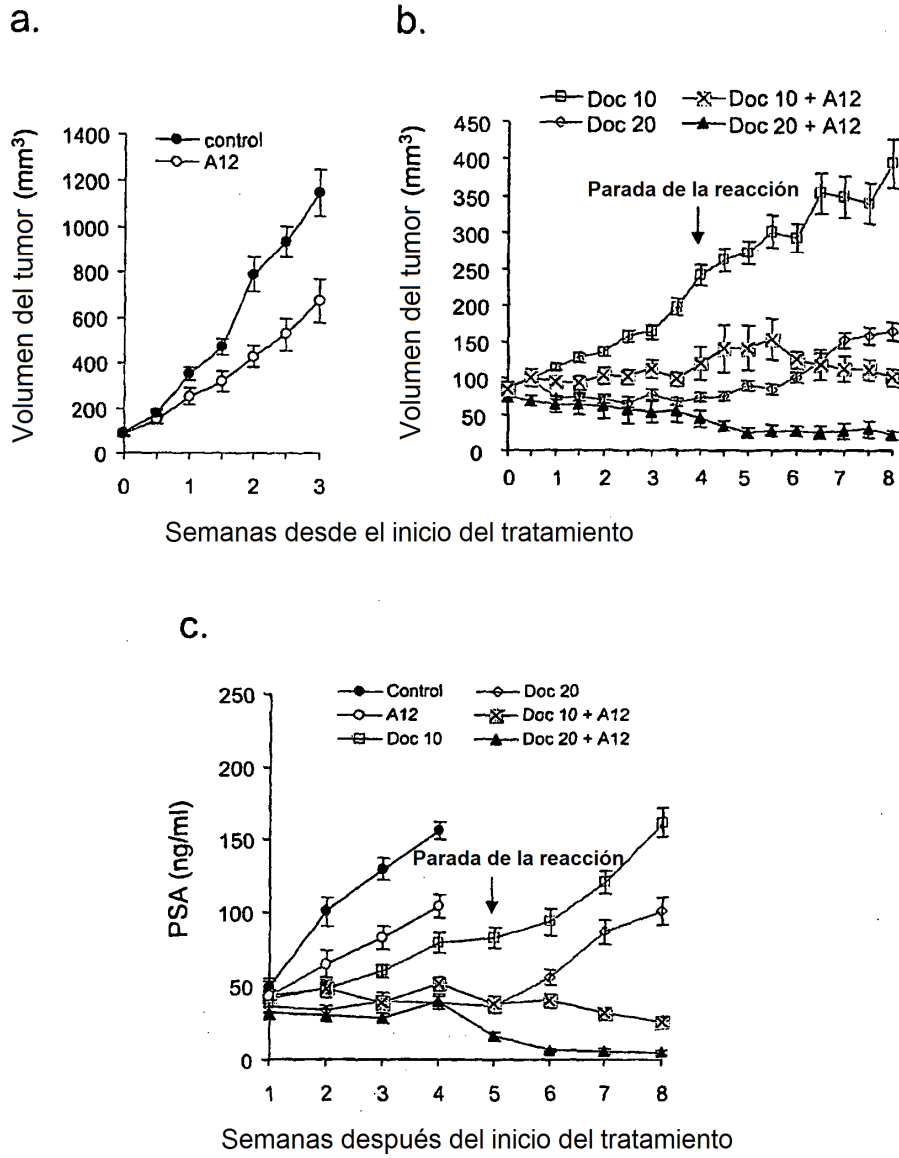


Fig. 1

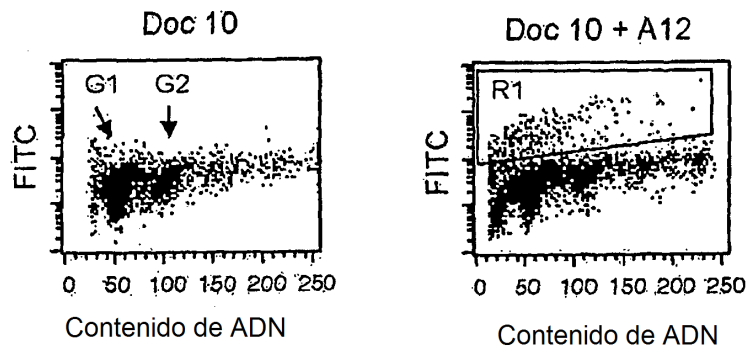


Fig. 2

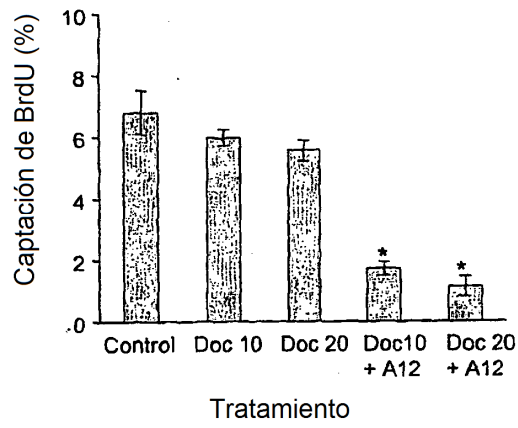


Fig. 3

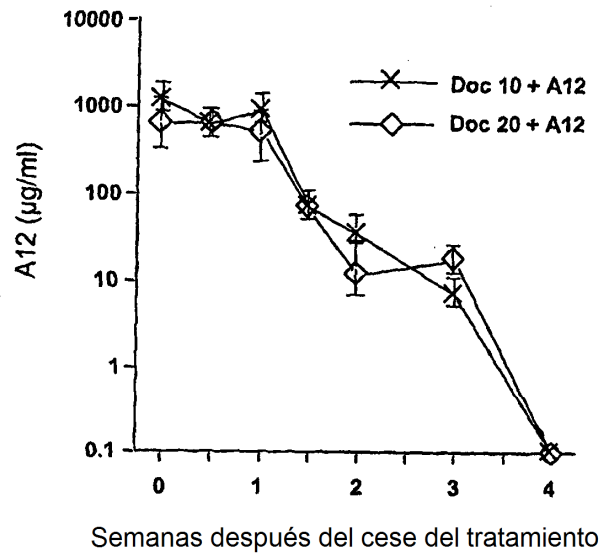


Fig. 5

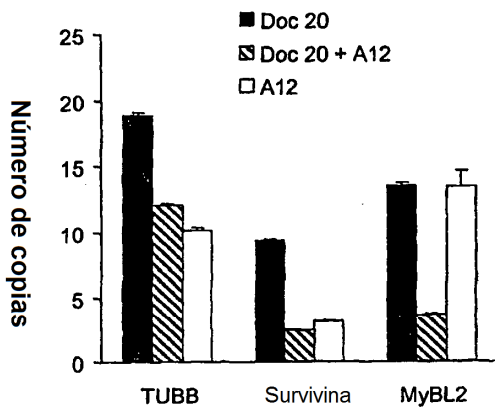


Fig. 4

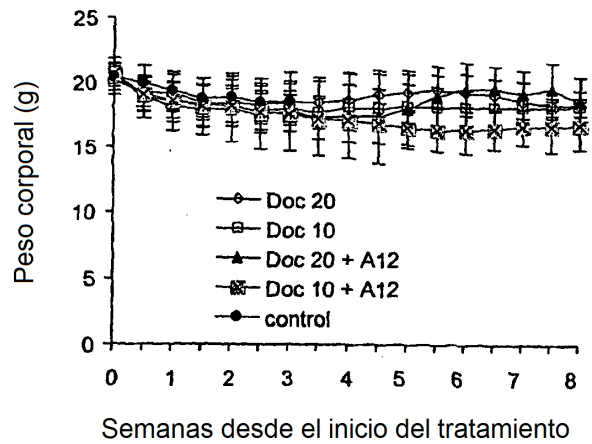


Fig. 6

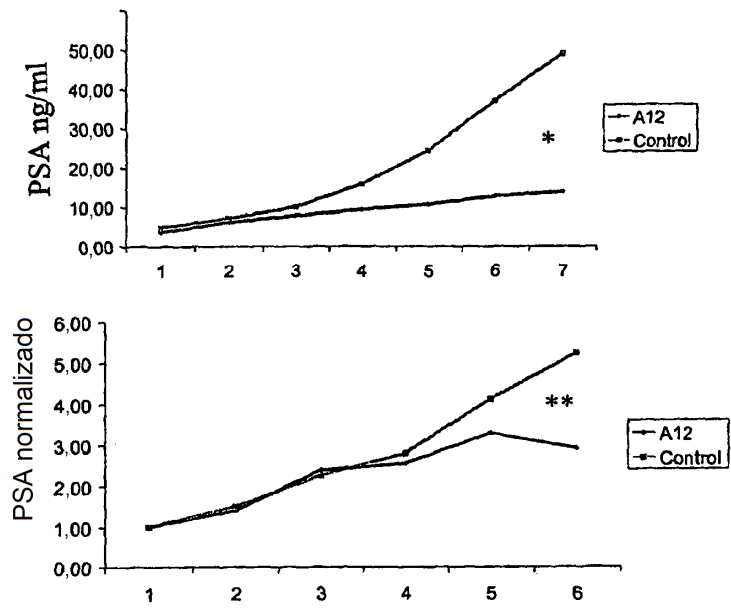


Fig. 7



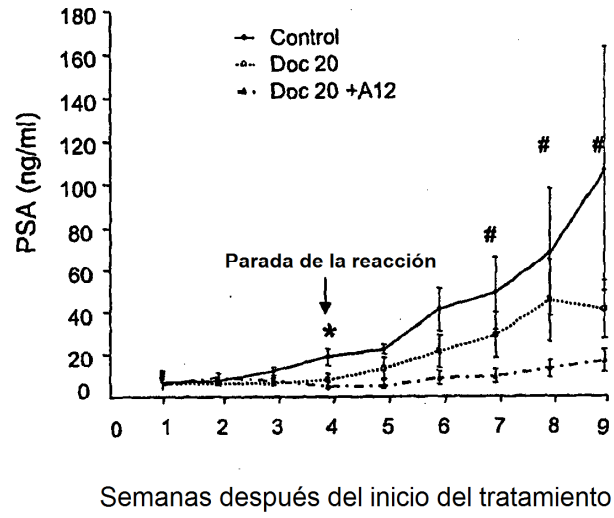
Control



A12

Fig. 8

a.



b.

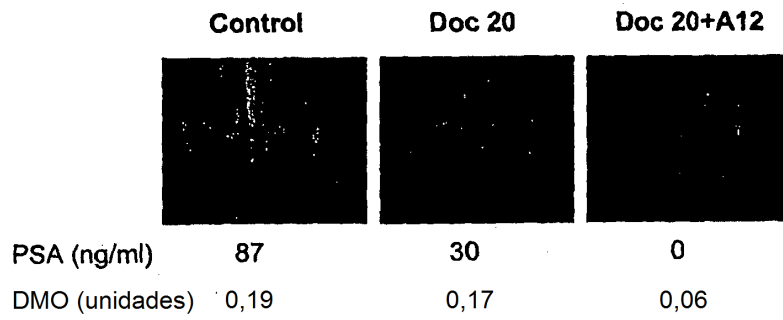


Fig. 9

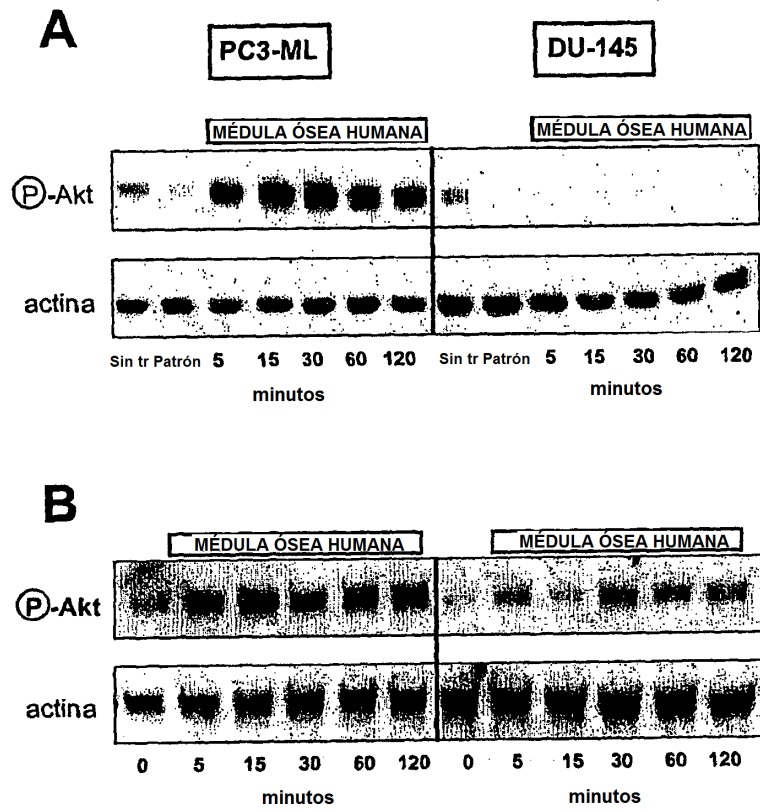


Fig. 10

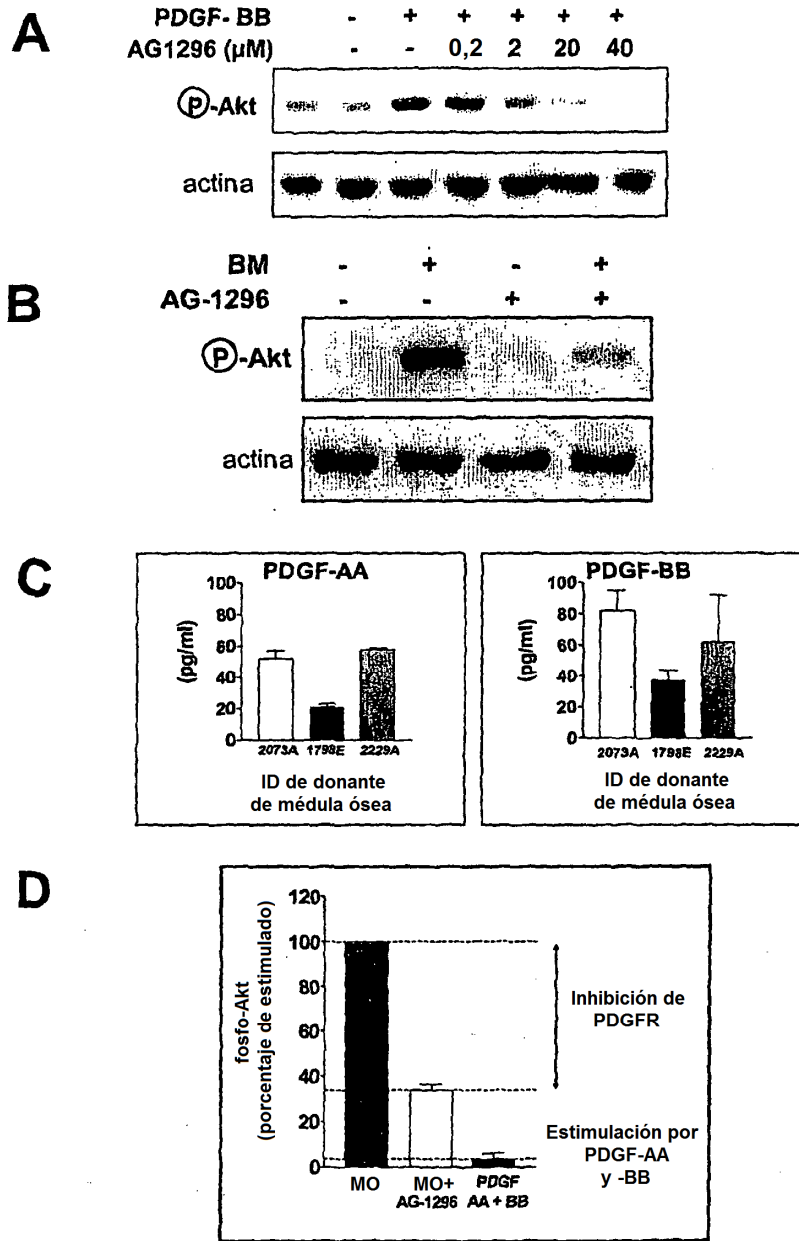


Fig. 11

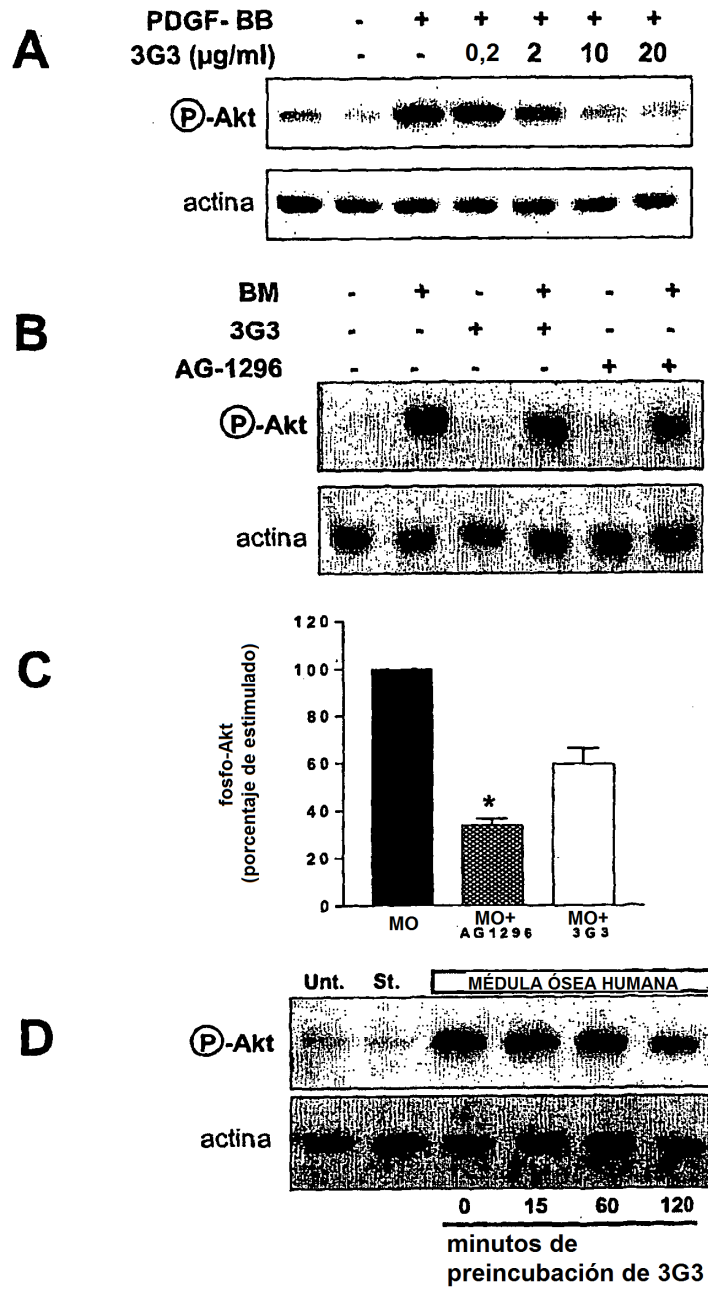


Fig. 12

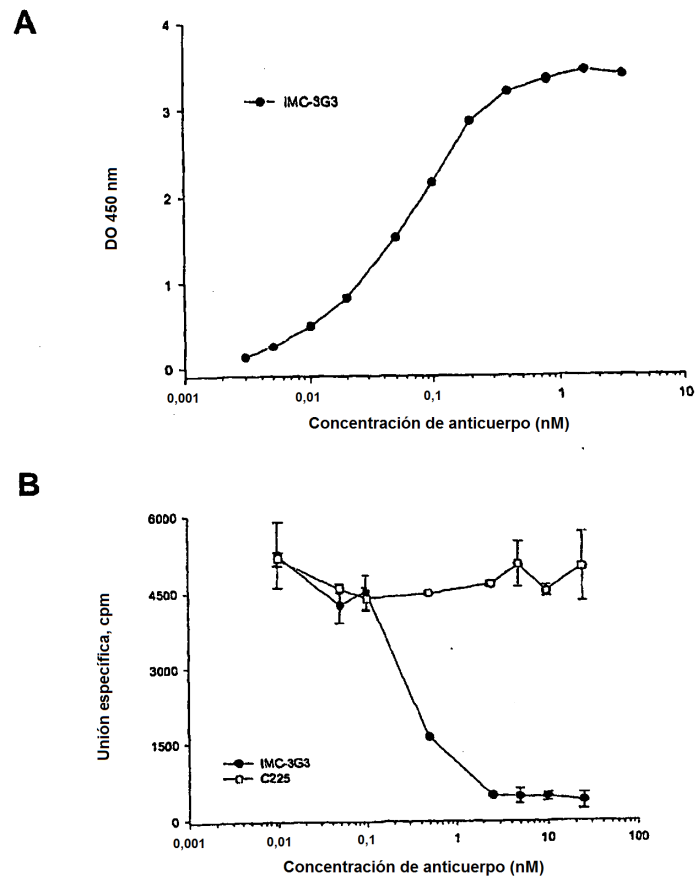


Fig. 13

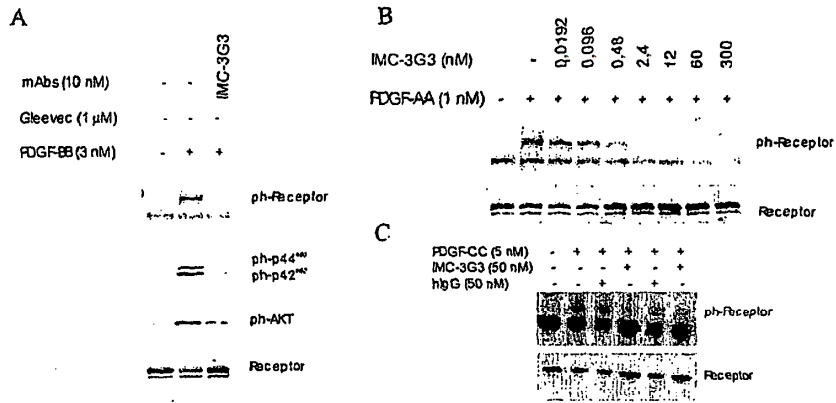


Fig. 14

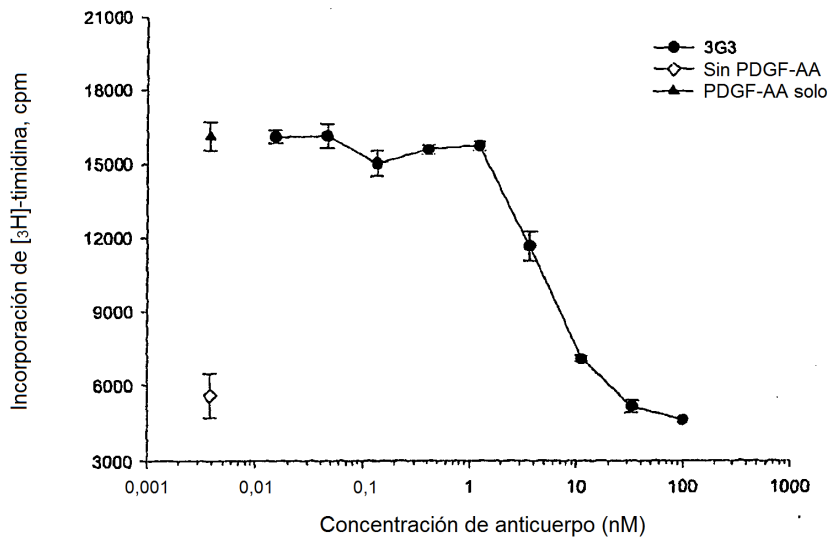


Fig. 15

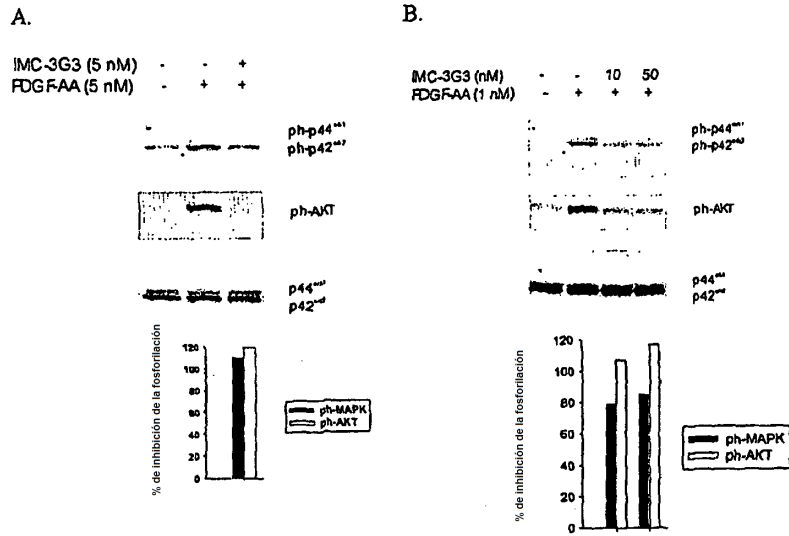


Fig. 16

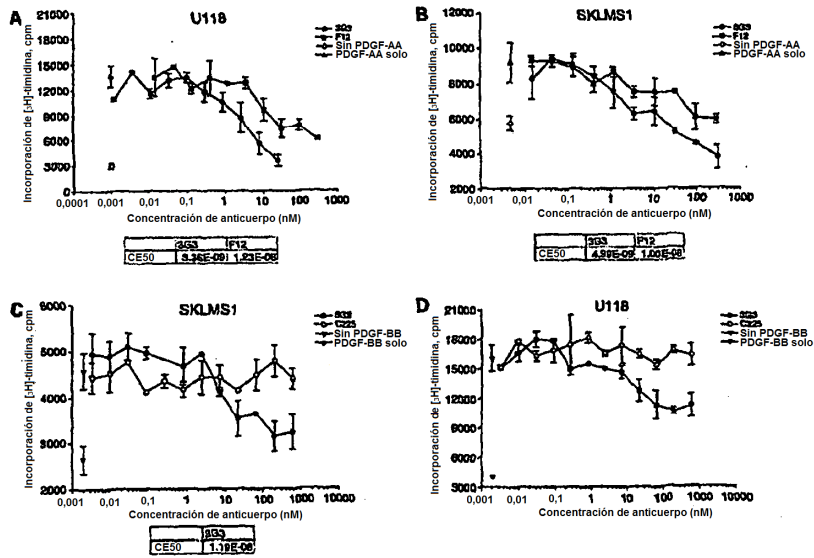


Fig. 17

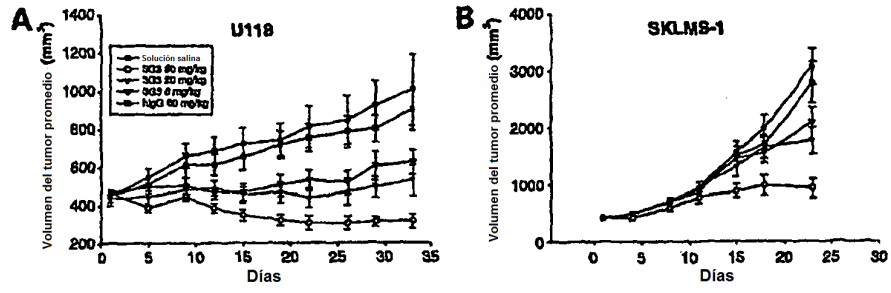


Fig. 18

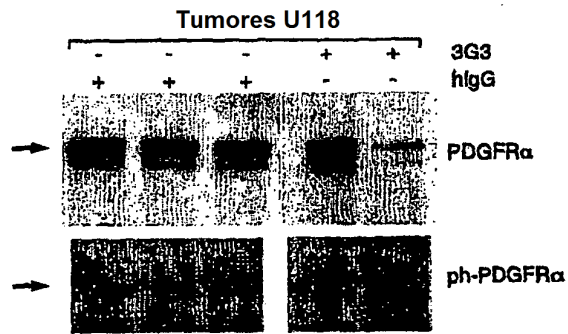


Fig. 19

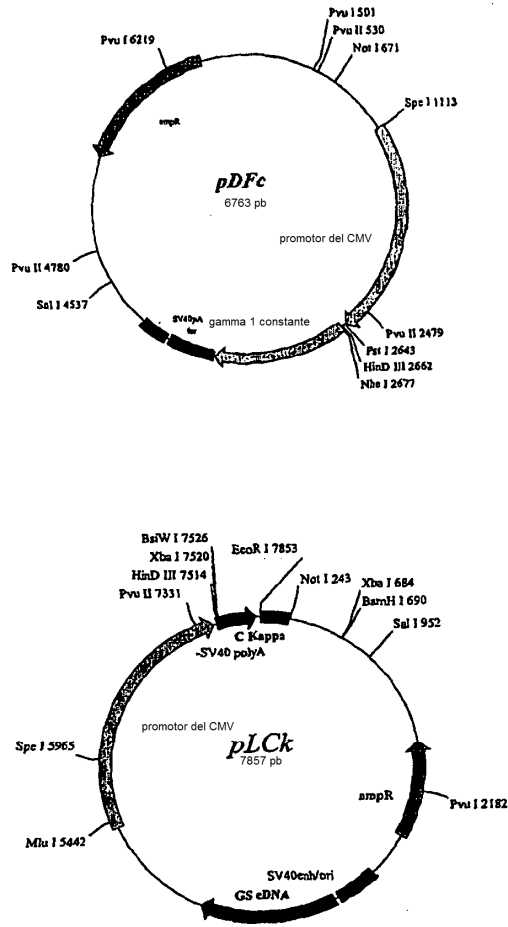


Fig. 20