SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

BT

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. **EXPEDIENTE No.** 06-68312

54. **TITULO** NOVEDOSOS ANTICUERPOS DE RECEPTOR HIBRIDO ANTI-INSULINA/IGF-I O DE RECEPTOR HIBRIDO ANTI-INSULINA/IGF-I E IGF-IR Y SUS USOS

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL** C07K16/28

71. **SOLICITANTE** PIERRE FABRE MEDICAMENT

DOMICILIO BOULOGNE-BILLANCOURT, FRANCIA

74. **APODERADO** JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. **SANTAFE DE BOGOTA, D.C.**

(FORMA P 10)

Oficina de Comunicaciones

PETITORIO

AS: 101.507

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-068312- -00000-0000
Fec: 2006-07-13 17:44:22 Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEIYII
Cve: 376 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 534

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL 16-07-06

1 SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)	Nombre: **PIERRE FABRE MEDICAMENT** Dirección: 45, Place Abel Gance, 92100 Boulogne-Billancourt, Francia Lugar de Constitución: Francia Teléfono: Fax: E-mail:	**IDENTIFICACION** C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual_____ Número
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO Dirección: Cra. 7 No. 16-56 Piso 9 Teléfono: 380-2200 Fax: 380-2700 E-mail:	**IDENTIFICACION** C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual_____ Número 80.410.337 TP 57492
4 INVENTOR (ES) (72)	**Nombre:** Liliane GOETSCH, Nathalie CORVAIA, Alain DUFLOS, Jean-François HAEUW, Olivier LEGER, Alain BECK **Dirección:** 15, Route de Cluses, F-74130 Ayze, FR; Résidence Les Chênes, 2, rue des Chênes, F-74160 Archamps, FR; 7, rue Emile-Caraguel, F-81290 Labruguière, FR; La Rose-des-Vents, 2, place de la Libération, F-74160 Saint-Julien-en-Genevois, FR; 22, rue Marc Courriard, F-74100 Annemasse, FR; 503, route du Poirier à l'Ane, F-74160 Collonges sous Salève, Francia (Respectivamente) **Nacionalidad o Domicilio:** Francia (Respectivamente)	

5 PCT (86)
Solicitud Internacional No. PCT/IB2004/004360 Fecha 16-12-2004
Publicación Internacional No. WO 2005/058967 A3 Fecha 30-06-2005

Título (54): NOVEDOSOS ANTICUERPOS DE RECEPTOR HÍBRIDO ANTI-INSULINA/IGF-I O DE RECEPTOR HÍBRIDO ANTI-INSULINA/IGF-I E IGF-IR Y SUS USOS

7 Clasificación Internacional (51) _____

8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	US	16-12-2003	10/735,916

9 Comprobante de pago No. 06-44,712 **Fecha** 13-07-2006

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10 **ANEXOS**

2

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. $463.000
- [x] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [x] Poderes, si fuere el caso. Fotocopia Autenticada
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- [ ] Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12x12
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [x] Otros: Tarjeta de Propietarios

11 ***FIGURA CARACTERÍSTICA:***

12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO**

FIRMA:

C.C. 80.410.337 de Usaquén T.P. 57492 del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-068312- -00000-0000
Fec: 2006-07-13 17:44:22 Dep: 2020 NUEVCREACIONES
Tra: 11 PATENTEIYII
Cve: 378 FASCINACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 534

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 44,712
FECHA : JUNIO 13 DE 2006

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	55100292	13/06/2006	32,447,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL : $	463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

AS: 10/1507

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
30 June 2005 (30.06.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/058967 A3

(51) International Patent Classification[7]: C07K 16/28, A61K 39/395

(21) International Application Number:
PCT/IB2004/004360

(22) International Filing Date:
16 December 2004 (16.12.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
10/735,916 16 December 2003 (16.12.2003) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: PIERRE FABRE MEDICAMENT [FR/FR]; 45, place Abel-Gance, F-92100 Boulogne Billancourt (FR).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: GOETSCH, Liliane [FR/FR]; 15, route de Cluses, F-74130 Ayze (FR). CORVAIA, Nathalie [FR/FR]; Résidence Les Chênes, 2, rue des Chênes, F-74160 Archamps (FR). DUFLOS, Alain [FR/FR]; 7, rue Emile-Carnguel, F-81290 Labruguière (FR). HAEUW, Jean-François [FR/FR]; Le Rose-des-Vents, 2, place de la Libération, F-74160 Saint-Julien-en-Genevois (FR). LEGER, Olivier [FR/FR]; 22, rue Marc Courriard, F-74100 Annemasse (FR). BECK, Alain [FR/FR]; 503, route du Poirier à l'Ane, F-74160 Collonges sous Salève (FR).

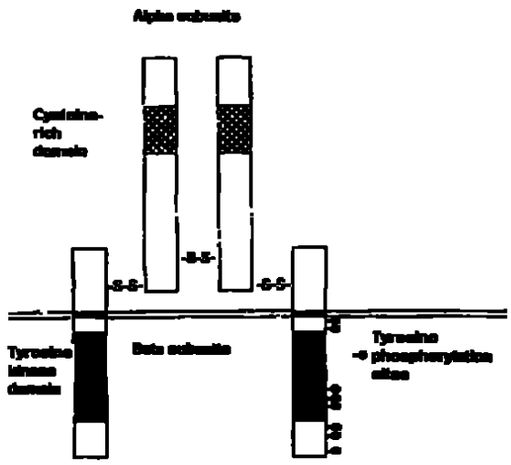
(74) Agent: MARTIN, Jean-Jacques; Cabinet Regimbeau, 20, rue de Chazelles, Cedex 17, F-75847 Paris (FR).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: NOVEL ANTI-INSULIN/IGF-I HYBRID RECEPTOR OR ANTI-INSULIN/IGF-I HYBRID RECEPTOR AND IGF-IR ANTIBODIES AND USES THEREOF



(57) Abstract: The present invention relates to antibodies capable of binding specifically to i) the human anti-insulin/IGF-I hybrid receptor (hybrid-R) or ii) both to said hybrid-R and the human insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) and/or capable of specifically inhibiting the tyrosine kinase activity of said hybrid-R or both hybrid-R and IGF-IR, especially monoclonal antibodies of murine, chimeric and humanized origin, as well as the amino acid and nucleic acid sequences coding for these antibodies. The invention likewise comprises the use of these antibodies as a medicament for the prophylactic and/or therapeutic treatment of cancers overexpressing, or with an abnormal activation of, hybrid-R or of both hybrid-R and IGF-IR or any pathology connected with the overexpression, or abnormal activation, of said receptor as well as in processes or kits for diagnosis of illnesses connected with the overexpression of the hybrid-R or both hybrid-R and IGF-IR. The invention finally comprises products and/or compositions comprising such antibodies in combination with anti-EGFR antibodies and/or compounds and/or anti-cancer agents or agents conjugated with toxins and their use for the prevention and/or the treatment of certain cancers.

WO 2005/058967 A3

Declarations under Rule 4.17:

— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii)) for the following designations AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, ARIPO patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)*

— *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for all designations*

— *of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only*

Published:

— *with international search report*

(88) Date of publication of the international search report:
23 March 2006

(15) Information about Correction:
Previous Correction:
see PCT Gazette No. 34/2005 of 25 August 2005, Section II

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

NOVEL ANTI-INSULIN/IGF-I HYBRID RECEPTOR OR ANTI-INSULIN/IGF-I HYBRID RECEPTOR AND IGF-IR ANTIBODIES AND USES THEREOF

The present invention relates to novel antibodies capable of binding specifically to i) the human Insulin/IGF-I hybrid receptor, isoform(s) A and/or B, (hereinafter referred as "hybrid-R" or sometimes as "hybrid-Rs", "hybrid-RsA" for isoform A or "hybrid-RsB" for isoform B) and/or ii) both the hybrid-R and insulin-like growth factor I receptor (hereinafter referred as "IGF-IR") and/or capable of specifically inhibiting the tyrosine kinase activity of said hybrid-R or of both hybrid-R and IGF-IR, especially monoclonal antibodies of murine, chimeric and humanized origin, as well as the amino acid and nucleic acid sequences coding for these antibodies. The invention likewise comprises the use of these antibodies as a medicament for the prophylactic and/or therapeutic treatment of cancers overexpressing, or with an abnormal activation of, hybrid-R or both hybrid-R and IGF-IR or any pathology connected with the overexpression, or an abnormal activation, of said receptor(s) as well as in processes or kits for diagnosis of illnesses connected with the overexpression, or an abnormal activation, of the hybrid-R or both hybrid-R and IGF-IR. The invention finally comprises products and/or compositions comprising such antibodies in combination with anti-EGFR antibodies and/or compounds and/or anti-cancer agents or agents conjugated with toxins and their use for the prevention and/or the treatment of certain cancers.

The insulin-like growth factor I receptor called IGF-IR is a receptor with tyrosine kinase activity having 70% homology with the insulin receptor (hereinafter referred as "IR"). Sequence(s) coding for IGF-IR are registered under Accession Number NM_000875 in the NCBI Genbank. Another data, without limitation and incorporated herein by reference, describing IGF-IR sequence(s) is Ulrich et al., 1986, EMBO J., 5(10):2503-2512. IGF-IR is a glycoprotein of molecular weight approximately 350,000. It is a hetero-tetrameric receptor of which each half-linked by disulfide bridges- is composed of an extracellular α-subunit and of a transmembrane β-subunit (see figure 1). IGF-IR binds its native ligands, preferably IGF1 and IGF2, with a very high affinity (Kd #1 nM) but is equally capable of binding to insulin with an

affinity 100 to 1000 times less. Conversely, the IR binds insulin with a very high affinity although the IGFs only bind to the IR with a 100 times lower affinity. The tyrosine kinase domain of IGF-IR and of IR has a very high sequence homology although the zones of weaker homology respectively concern the cysteine-rich region situated on the α-subunit and the C-terminal part of the β-subunit. The sequence differences observed in the α-subunit are situated in the binding zone of the ligands and are therefore at the origin of the relative affinities of IGF-IR and of IR for the IGFs and insulin respectively. The differences in the C-terminal part of the β-subunit result in a divergence in the signalling pathways of the two receptors; IGF-IR mediating mitogenic, differentiation and antiapoptosis effects, while the activation of the IR principally involves effects at the level of the metabolic pathways (Baserga et al., Biochim. Biophys. Acta, 1332:F105-126, 1997; Baserga R., Exp. Cell. Res., 253:1-6, 1999).

The cytoplasmic tyrosine kinase proteins are activated by the binding of the ligand to the extracellular domain of the receptor. The activation of the kinases in its turn involves the stimulation of different intra-cellular substrates, including IRS-1, IRS-2, Shc and Grb 10 (Peruzzi F. et al., J. Cancer Res. Clin. Oncol., 125:166-173, 1999). The two major substrates of IGF-IR are IRS and Shc which mediate, by the activation of numerous effectors downstream, the majority of the growth and differentiation effects connected with the attachment of the IGFs to this receptor (figure 2). The availability of substrates can consequently dictate the final biological effect connected with the activation of the IGF-IR. When IRS-1 predominates, the cells tend to proliferate and to transform. When Shc dominates, the cells tend to differentiate (Valentinis B. et al., J. Biol. Chem., 274:12423-12430, 1999). It seems that the route principally involved for the effects of protection against apoptosis is the phosphatidyl-inositol 3-kinases (PI 3-kinases) route (Prisco M. et al., Horm. Metab. Res., 31:80-89, 1999; Peruzzi F. et al., J. Cancer Res. Clin. Oncol., 125:166-173, 1999).

The role of the IGF system in carcinogenesis has become the subject of intensive research in the last ten years. This interest followed the discovery of the fact that in addition to its mitogenic and antiapoptosis properties, IGF-IR seems to be

required for the establishment and the maintenance of a transformed phenotype. In fact, it has been well established that an overexpression or a constitutive activation of IGF-IR leads, in a great variety of cells, to a growth of the cells independent of the support in media devoid of fetal calf serum, and to the formation of tumors in nude mice. This in itself is not a unique property since a great variety of products of overexpressed genes can transform cells, including a good number of receptors of growth factors. However, the crucial discovery which has clearly demonstrated the major role played by IGF-IR in the transformation has been the demonstration that the R- cells, in which the gene coding for IGF-IR has been inactivated, are totally refractory to transformation by different agents which are usually capable of transforming the cells, such as the E5 protein of bovine papilloma virus, an overexpression of EGFR or of PDGFR, the T antigen of SV 40, activated ras or the combination of these two last factors (Sell C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90:11217-11221, 1993; Sell C. et al., Mol. Cell. Biol., 14:3604-3612, 1994; Morrione A. J., Virol., 69:5300-5303, 1995; Coppola D. et al., Mol. Cell. Biol., 14:4588-4595, 1994; DeAngelis T et al., J. Cell. Physiol., 164:214-221, 1995).

IGF-IR is expressed in a great variety of tumors and of tumor lines and the IGFs amplify the tumor growth via their attachment to IGF-IR. Other arguments in favor of the role of IGF-IR in carcinogenesis come from studies using murine monoclonal antibodies directed against the receptor or using negative dominants of IGF-IR. In effect, murine monoclonal antibodies directed against IGF-IR inhibit the proliferation of numerous cell lines in culture and the growth of tumor cells *in vivo* (Arteaga C. et al., Cancer Res., 49:6237-6241, 1989; Li et al., Biochem. Biophys. Res. Com., 196:92-98, 1993; Zia F et al., J. Cell. Biol., 24:269-275, 1996; Scotlandi K et al., Cancer Res., 58:4127-4131, 1998). It has likewise been shown in the works of Jiang et al. (Oncogene, 18:6071-6077, 1999) that a negative dominant of IGF-IR is capable of inhibiting tumor proliferation.

For the first time, data illustrating the recognition of hybrid-R or both hybrid-R and IGF-IR by the same monoclonal antibody able to inhibit specifically, *in vitro* and *in vivo*, the tumoral growth, thus allowing to treat cancer, more particularly breast cancer,

able to conjointly express the two receptor types are shown in the present example (see particularly example 26). Actually, the capacity of 7C10 and h7C10 to recognize and/or inhibit the tyrosine kinase activity of hybrid-R or both hybrid-R and IGF-IR allow to avoid the escape of tumor consequent upon the expression, or the abnormal activation, of this hybrid-R. Such an antibody could be an innovative therapeutic compound of a essential interest for the treatment of cancer.

Cancer pathologies are characterized by an uncontrolled cellular growth. In several cancer, growth factors are specifically binding with their receptors and then transmit growth, transformation and/or survival signals to the tumoral cell. The growth factor receprtors over-expression at the tumoral cell surface is largely described (Salomon DS et al., Crit. Rev. Oncol. Hematol., 1995, 19:183; Burrow S. et al., J. Surg. Oncol., 1998, 69:21 ; Hakam A. et al., Hum. Pathol., 1999, 30:1128; Railo M.J. et al., Eur. J. Cancer, 1994, 30:307; Happerfield L.C. et al., J. Pathol., 1997, 183:412). This over-expression, or abnormal activation, leading to a direct perturbation of cellular growth regulation mechanisms, can also affect the cell sensibility to induced apoptose by classical chemotherapies or radiotherapies.

During last few years, it has been show that the targeting of growth factor receptors, like EGFR or Her2/neu over-expressed on the tumoral cell surface, with respectively humanized (herceptin®) or chimeric (C225) antibodies results in an significant inhibition of the tumoral growth on patients and in a significant increase of the efficacity of classical chemotherapy treatments (Carter P., Nature Rev. Cancer, 2001, 1(2):118; Hortobagyi G. N., Semin. Oncol., 2001, 28:43; Herbst R.S. et al., Semin. Oncol., 2202, 29:27). Other receptors like IGF-IR or VEGF-R (for vascular endothelial growth factor receptor) have been identified as potential target in several preclinical studies.

More particularly, IGF-IR is part of the tyrosine kinase receptors. It shows a high homology with the Insulin receptor (IR) which exist under two isoforms A and B. Sequences of IR, isoforms A and B, are registered under Accession Numbers X02160 and M10051, respectively, in the NCBI Genbank. Other datas, without limitations, relating to IR are incorporated herein by references (Vinten et al., 1991, Proc. Natl.

Acad. Sci. USA, 88:249-252; Belfiore et al., 2002, The Journal of Biological Chemistry, 277:39684-39695; Dumesic et al., 2004, The Journal of Endocrinology & Metabolism, 89(7):3561-3566).

The IGF-IR and IR are tetrameric glycoproteins composed of two extracellular α- and two transmembrane β-subunits linked by disulfide bonds. Each α-subunit, containing the ligand-binding site is approximately 130- to 135-kDa, whereas each β-subunit containing the tyrosine kinase domain is approximately 90- to 95- kDa. These receptors share more than 50% overall amino acid sequence similarity and 84% similarity in the tyrosine kinase domain. After ligand binding, phosphorylated receptors recruit and phosphorylate docking proteins, including the insulin receptor substrate-1 protein family (IRS1), Gab1 and Shc (Avruch, 1998, Mol.Cell. Biochem., 182:31-48; Roth et al., 1988, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 53:537-543; White, 1998, Mol. Cell. Biochem., 182:3-11; Laviola et al., 1997, J. Clin. Invest., 99:830-837; Cheatham et al., 1995, Endocr. Rev., 16:117-142), leading to the activation of different intracellular mediators. Although both the IR and IGF-IR similarly activate major signalling pathways, differences exist in the recruitment of certain docking proteins and intracellular mediators between both receptors (Sasaoka et al., 1996, Endocrinology 137:4427-4434; Nakae et al., 2001, Endocr. Rev., 22:818-835; Dupont and Le Roith, 2001, Horm. Res., 55, Suppl.2:22-26; Koval et al., 1998, Biochem. J., 330:923-932). These differences are the basis for the predominant metabolic effects elicited by IR activation and the predominant mitogenic, transforming and anti-apoptotic effects elicited by IGF-IR activation (De Meyts et al., 1995, Ann. N.Y. Acad. Sci., 766:388-401; Singh et al., 2000, Prisco et al., 1999, Horm. Metab. Res., 31:80-89 ; Kido et al., 2001, J. Clin. Endocrinol. Metab., 86:972-979). Insulin binds with high affinity to the IR (100-fold higher than to the IGF-IR), whereas insulin-like growth factors (IGF1 and IGF2) bind to the IGF-IR with 100-fold higher affinity than to the IR.

The human IR exists in two isoforms, IR-A and IR-B, generated by alternative splicing of the IR gene that either excludes or includes 12 amino acid residues encoded by a small exon (exon 11) at the carboxy-terminus of the IR α-subunit. The relative abundance of IR isoforms is regulated by tissue specific and unknown factors (Moller et al., 1989, Mol. Endocrinol., 3:1263-1269; Mosthaf et al., 1990, EMBO J., 9:2409-2413). IR-B is the predominant IR isoform in normal adult tissues (adipose tissue, liver

and muscle) that are major target tissues for the metabolic effects of insulin (Moller et al., 1989; Mosthaf et al., 1990). IR-A is the predominant isoform in fetal tissues and mediates fetal growth in response to IGF2 (Frasca et al., 1999, Mol. Cell. Biol., 19:3278-3288), as also suggested by genetic studies carried out in transgenic mice (DeChiara et al., 1990, Nature ,345:78-80; Louvi et al., 1997, Dev. Biol., 189:33-48). Moreover, when cells transform and become malignant, dedifferentiation is often associated with an increased IR-A relative abundance (Pandini et al., 2002, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 277, N° 42, pp39684-39695).

Given the high degree of homology, the insulin and IGF-I half-receptors (composed of one α- and one β-subunit) can heterodimerize, leading to the formation of insulin/IGF-I hybrid receptors (Hybrid-R) (Soos et al., 1990, Biochem J., 270:383-390; Kasuya et al., 1993, Biochemistry, 32:13531-13536; Seely et al., 1995, Endocrinology 136:1635-1641; Bailyes et al., 1997, Biochem J., 327:209-215).

Both IR isoforms are equally able to form hybrids with IGF-IR. Hybrid-R, however, have different functional characteristics. Hybrid-RsB has reduced affinity for IGF1 and especially for IGF2. In contrast, Hybrid-RsA has a high affinity for IGF1 and bind also IGF2 and insulin at a physiological concentration range. The expression of Hybrid-RsA up-regulates the IGF system by two different mechanisms i) binding (with high affinity) and activation by both IGF1 and IGF2 (which do not occur with the Hybrid-RsB), ii) activation of the IGF-IR pathway after insulin binding. Insulin binding to Hybrid-RsA phosphorylates the IGF-IR β-subunit and activates an IGF-IR-specific substrate (CrkII) so that Hybrid-RsA shifts insulin to IGF-IR signaling (Pandini et al., 2002).

In several tissues, like liver, spleen or placenta, Hybrid-R are more represented than IGF-IR (Bailyes et al., 1997). As tumor tissues overexpress, or present an abnormal activation, both IGF-IR and IR-A (Frasca et al., 1999; Sciacca et al., 1999, Oncogene 18:2471-2479; Vella et al., 2001, Mol. Pathol., 54:121-124), Hybrid-RsA may also be overexpressed in a variety of human malignancies, including thyroid and breast cancers providing a selective growth advantage to malignant cells able to respond by a type IGF-IR signalisation following a stimulation by IGF1 and/or IGF2 but also by insulin at physiological concentrations (Bailyes et al., 1997; Pandini et al., 1999, Clin.

Cancer Res., 5:1935-1944 ; Belfiore et al., 1999, Biochimie (Paris) 81:403-407 ; Frasca et al., 1999 ; Sciacca et al., 1999 ; Vella et al., 2001).

The realisation of such "therapeutic tools" able to block in the same time the two receptors is of particular interest as they will allow to avoid the escape phenomena mediated by the expression, or abnormal activation, in a same tumor of hybrid-R or both hybrid-R and IGF-IR.

The present invention allows to block the hybrid-R activity by generating a compound, and more particularly an antibody, of high affinity able to bind to said receptor and also to block its activation by its native ligands, preferably IGF1, IGF2 or Insulin.

The present invention also allows to jointly block the hybrid-R and IGF-IR activity by generating a compound, and more particularly an antibody, of high affinity able to bind to said two receptors and also to block their activation respectively their native ligands, preferably by IGF1, IGF2 or Insulin.

The present invention also deals with the use of an isolated antibody according to the present invention, or a fragment thereof, said antibody or fragment being able to bind to i) human hybrid-R, and/or to inhibit the binding of its native ligands, preferably IGF1, IGF2 and/or Insulin, and/or also able to specifically inhibit the tyrosine kinase activity of said hybrid-R, and/or ii) both human hybrid-R and human IGF-IR ,and/or to inhibit the binding of their native ligands, preferably IGF1 and/or IGF2 and/or insulin, and/or also able to inhibit specifically the tyrosine kinase activity of said hybrid-R and IGF-IR.

More particularly, in a preferred embodiment, said antibody is characterized in that it comprises the sequences of the 7C10 and h7C10 antibodies anti-IGF-IR, and fragment thereof, of the present invention, notably the antibodies anti-IGF-IR according to the present invention having a light chain comprising at least a CDR region selected in the group consisting in SEQ ID No. 2, 4 or 6 (or at least a CDR with at least 80% of homology after optimal alignment with SEQ ID No. 2, 4 or 6), and/or a heavy chain comprising at least a CDR region selected in the group consisting in SEQ ID No. 8, 10

or 12 (or at least a CDR with at least 80% of homology after optimal alignment with SEQ ID No. 8, 10 or 12).

According to another preferred embodiment, said antibody is used for cancer therapy, more particularly breast cancer therapy.

Actually, it is known that breast tumoral cells specifically present on their surface IGF-IR but also a great number of Insulin receptor and, as a consequence, a great number of Hybrid-R (Frasca et al., 1999; Sciacca et al., 1999; Vella et al., 2001).

The object of the present invention is to be able to have available a murine monoclonal antibody, preferably a chimerized or humanized antibody, which will recognize hybrid-R or both hybrid-R and IGF-IR specifically and with great affinity. This antibody will interact little or not at all with the IR on insulin. Its attachment will be able to inhibit *in vitro* the growth of tumors expressing, or with an abnormal activation of, hybrid-R or both hybrid-R and IGF-IR by interacting principally with the signal transduction pathways activated during interactions between i) hybrid-R with its native ligands, preferably IGF1, IGF2 and insulin and/or ii) both hybrid-R and IGF-IR with their respective native ligands, preferably IGF1, IGF2, insulin for hybrid-R and IGF1, IGF2 for IGF-IR. This antibody will be able to be active *in vivo* on all the types of tumors expressing, or with an abnormal activation of, hybrid-R or both hybrid-R and IGF-IR including estrogen-dependent tumors of the breast and tumors of the prostate, which is not the case for the anti-IGF-IR monoclonal antibodies (written MAb or MAB) currently available. In effect, αIR3, which refers to the domain of IGF-IR, totally inhibits the growth of estrogen-dependent tumors of the breast (MCF-7) *in vitro* but is without effect on the corresponding model *in vivo* (Arteaga C. et al., J. Clin. Invest. 84:1418-1423, 1989). In the same way, the scFv-Fc fragment derived from the murine monoclonal 1H7 is only weakly active on the tumor of the breast MCF-7 and totally inactive on an androgen-independent tumor of the prostate (Li S.L. et al., Cancer Immunol. Immunother., 49:243-252, 2000). None of these known antibodies are described as being able to recognize, or inhibit the tyrosine kinase activity, of the hybrid-R.

In a surprising manner, the inventors have demonstrated a chimeric antibody (called C7C10) and two humanized antibodies respectively called h7C10 humanized form 1 and h7C10 humanized form 2, derivatives of the murine monoclonal antibody 7C10, recognising hybrid-R or both hybrid-R and IGF-IR and corresponding to all of the criteria stated above, that is to say to a nonrecognition of the receptor on the insulin, to an *in vitro* blockage of the IGF1 and/or IGF2 proliferation induced but likewise to the *in vivo* inhibition of the growth of different tumors expressing, or with an abnormal activation of, hybrid-R or both hybrid-R and IGF-IR among which are an osteosarcoma, a non-small cell lung tumor and a pancreatic tumor BxPC3 but likewise and more particularly the estrogen-dependent tumor of the breast MCF-7 and an androgen-independent tumor of the prostate DU-145. In the same way, and in a surprising manner, the intensity of inhibition of the tumor growth of MCF-7 cells *in vivo* by the antibody 7C10 is comparable, or even significantly superior, to that observed with tamoxifen, one of the reference compounds in the treatment of estrogen-dependent tumors of the breast. Furthermore, it has been shown that these antibodies inhibit the phosphorylation of the tyrosine of the beta chain of IGF-IR and of IRS1, the first substrate of the receptor. Moreover, it has likewise been established that these antibodies cause the internalization of said receptor and its degradation contrary to what is usually observed with natural ligands which allow the rapid recycling of the receptor on the surface of the cells. It has been possible to characterize these antibodies by their peptidic and nucleic sequence, especially by the sequence of their regions determining their complementarity (CDR) for hybrid-R and/or IGF-IR.

As the compound is preferably of IgG1 isotype, other mechanisms of action involving effector functions, such as for example ADCC and/or CDC, could explain the *in vivo* efficacy of the antobody of the present invention.

Thus, according to a first embodiment, a subject of the present invention is an isolated antibody, or one of its functional fragments, said antibody or one of its said fragments being characterized in that it is capable of binding to the hybrid-R, isoform(s) A and/or B, and inhibiting the binding of its native ligand, preferably designated herein as IGF1 and/or IGF2 and/or insulin, and/or capable of specifically inhibiting the

tyrosine kinase activity of said hybrid-R, said isolated antibody comprising a light chain comprising at least one complementarity determining region CDR chosen from the CDRs of sequence SEQ ID Nos. 2, 4 and 6, and/or comprising a heavy chain comprising at least one CDR chosen from the CDRs of sequence SEQ ID Nos. 8, 10 and 12.

In the present description, the terms "to bind" and "to attach" have the same meaning and are inter-changeable.

In the present description, the terms polypeptides, polypeptide sequences, peptides and proteins attached to antibody compounds or to their sequence are interchangeable.

It must be understood here that the invention does not relate to the antibodies in natural form, that is to say they are not in their natural environment but that they have been able to be isolated or obtained by purification from natural sources, or else obtained by genetic recombination, or by chemical synthesis, and that they can then contain unnatural amino acids as will be described further on.

By CDR region or CDR, it is intended to indicate the hypervariable regions of the heavy and light chains of the immunoglobulins as defined by Kabat et al. (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, and later editions). 3 heavy chain CDRs and 3 light chain CDRs exist. The term CDR or CDRs is used here in order to indicate, according to the case, one of these regions or several, or even the whole, of these regions which contain the majority of the amino acid residues responsible for the binding by affinity of the antibody for the antigen or the epitope which it recognizes.

By "percentage of identity" between two nucleic acid or amino acid sequences in the sense of the present invention, it is intended to indicate a percentage of nucleotides or of identical amino acid residues between the two sequences to be compared, obtained after the best alignment (optimum alignment), this percentage being purely statistical and the differences between the two sequences being distributed randomly and over their entire length. The comparisons of sequences between two nucleic acid or amino acid sequences are traditionally carried out by comparing these sequences after having aligned them in an optimum manner, said comparison being able

to be carried out by segment or by "comparison window". The optimum alignment of the sequences for the comparison can be carried out, in addition to manually, by means of the local homology algorithm of Smith and Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], by means of the local homology algorithm of Neddleman and Wunsch (1970) [J. Mol. Biol., 48:443], by means of the similarity search method of Pearson and Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444), by means of computer software using these algorithms (GAP, BESTFIT, FASTA and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, or else by BLAST N or BLAST P comparison software).

The percentage of identity between two nucleic acid or amino acid sequences is determined by comparing these two sequences aligned in an optimum manner and in which the nucleic acid or amino acid sequence to be compared can comprise additions or deletions with respect to the reference sequence for an optimum alignment between these two sequences. The percentage of identity is calculated by determining the number of identical positions for which the nucleotide or the amino acid residue is identical between the two sequences, by dividing this number of identical positions by the total number of positions in the comparison window and by multiplying the result obtained by 100 in order to obtain the percentage of identity between these two sequences.

For example, it is possible to use the BLAST program, "BLAST 2 sequences" (Tatusova et al., "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) available on the site http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ gorf/bl2.html, the parameters used being those given by default (in particular for the parameters "open gap penalty" : 5, and "extension gap penalty" : 2; the matrix chosen being, for example, the matrix "BLOSUM 62" proposed by the program), the percentage of identity between the two sequences to be compared being calculated directly by the program.

By amino acid sequence having at least 80%, preferably 85%, 90%, 95% and 98% identity with a reference amino acid sequence, those having, with respect to the reference sequence, certain modifications, in particular a deletion, addition or substitution of at least one amino acid, a truncation or an elongation are preferred. In the

case of a substitution of one or more consecutive or nonconsecutive amino acid(s), the substitutions are preferred in which the substituted amino acids are replaced by "equivalent" amino acids. The expression "equivalent amino acids" is aimed here at indicating any amino acid capable of being substituted with one of the amino acids of the base structure without, however, essentially modifying the biological activities of the corresponding antibodies and such as will be defined later, especially in the examples.

These equivalent amino acids can be determined either by relying on their structural homology with the amino acids which they replace, or on results of comparative trials of biological activity between the different antibodies capable of being carried out.

By way of example, mention is made of the possibilities of substitution capable of being carried out without resulting in a profound modification of the biological activity of the corresponding modified antibody. It is thus possible to replace leucine by valine or isoleucine, aspartic acid by glutamic acid, glutamine by asparagine, arginine by lysine, etc., the reverse substitutions being naturally envisageable under the same conditions.

The antibodies according to the present invention are preferably specific monoclonal antibodies, especially of murine, chimeric or humanized origin, which can be obtained according to the standard methods well known to the person skilled in the art.

In general, for the preparation of monoclonal antibodies or their functional fragments, especially of murine origin, it is possible to refer to techniques which are described in particular in the manual "Antibodies" (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988) or to the technique of preparation from hybridomas described by Kohler and Milstein (Nature, 256:495-497, 1975).

The monoclonal antibodies according to the invention can be obtained, for example, from an animal cell immunized against the hybrid-R or both against the hybrid-R and IGF-IR, or one of their fragments containing the epitope specifically

recognized by said monoclonal antibodies according to the invention. Said hybrid-R or both hybrid-R and IGF-IR, or one of their said fragments, can especially be produced according to the usual working methods, by genetic recombination starting with a nucleic acid sequence contained in the cDNA sequence coding for the hybrid-R or IGF-IR or by peptide synthesis starting from a sequence of amino acids comprised in the peptide sequence of the hybrid-R or IGF-IR.

The monoclonal antibodies according to the invention can, for example, be purified on an affinity column on which the hybrid-R and/or IGF-IR or one of their fragments containing the epitope specifically recognized by said monoclonal antibodies according to the invention has previously been immobilized. More particularly, said monoclonal antibodies can be purified by chromatography on protein A and/or G, followed or not followed by ion-exchange chromatography aimed at eliminating the residual protein contaminants as well as the DNA and the LPS, in itself followed or not followed by exclusion chromatography on Sepharose gel in order to eliminate the potential aggregates due to the presence of dimers or of other multimers. In an even more preferred manner, the whole of these techniques can be used simultaneously or successively. Such a purification can be done in the same time or sequenced with first a recognation on hybrid-R and, in a second step, the recognation of the IGF-IR.

Chimeric or humanized antibodies are likewise included in antibodies according to the present invention.

By chimeric antibody, it is intended to indicate an antibody which contains a natural variable (light chain and heavy chain) region derived from an antibody of a given species in combination with the light chain and heavy chain constant regions of an antibody of a species heterologous to said given species.

The antibodies or their fragments of chimeric type according to the invention can be prepared by using the techniques of genetic recombination. For example, the chimeric antibody can be produced by cloning a recombinant DNA containing a promoter and a sequence coding for the variable region of a nonhuman, especially murine, monoclonal antibody according to the invention and a sequence coding for the constant region of human antibody. A chimeric antibody of the invention encoded by such a recombinant gene will be, for example, a mouse-man chimera, the specificity of

this antibody being determined by the variable region derived from the murine DNA and its isotype determined by the constant region derived from the human DNA. For the methods of preparation of chimeric antibodies, it is possible, for example, to refer to the document Verhoeyn et al. (BioEssays, 8:74, 1988).

By humanized antibody, it is intended to indicate an antibody which contains CDR regions derived from an antibody of nonhuman origin, the other parts of the antibody molecule being derived from one (or from several) human antibodies. Moreover, some of the residues of the segments of the skeleton (called FR) can be modified in order to conserve the affinity of the binding (Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986; Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536, 1988; Riechmann et al., Nature, 332:323-327, 1988).

The humanized antibodies according to the invention or their fragments can be prepared by techniques known to the person skilled in the art (such as, for example, those described in the documents Singer et al., J. Immun., 150:2844-2857, 1992; Mountain et al., Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10:1-142, 1992; or Bebbington et al., Bio/Technology, 10:169-175, 1992). Such humanized antibodies according to the invention are preferred for their use in *in vitro* diagnostic methods, or *in vivo* prophylactic and/or therapeutic treatment.

By functional fragment of an antibody according to the invention, it is intended to indicate in particular an antibody fragment, such as Fv, scFv (sc for single chain), Fab, $F(ab')_2$, Fab', scFv-Fc fragments or diabodies, or any fragment of which the half-life time would have been increased by chemical modification, such as the addition of poly(alkylene) glycol such as poly(ethylene) glycol ("PEGylation") (pegylated fragments called Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, $F(ab')_2$-PEG or Fab'-PEG) ("PEG" for Poly(Ethylene) Glycol), or by incorporation in a liposome, said fragments having at least one of the characteristic CDRs of sequence SEQ ID No. 2, 4, 6, 8, 10 or 12 according to the invention, and, especially, in that it is capable of exerting in a general manner an even partial activity of the antibody from which it is descended, such as in particular the capacity to recognize and to bind to the hybrid-R or both the hybrid-R and IGF-IR, and, if necessary, to inhibit the activity of the hybrid-R or both the hybrid-R and the IGF-IR.

Preferably, said functional fragments will be constituted or will comprise a partial sequence of the heavy or light variable chain of the antibody from which they are derived, said partial sequence being sufficient to retain the same specificity of binding as the antibody from which it is descended and a sufficient affinity, preferably at least equal to 1/100, in a more preferred manner to at least 1/10, of that of the antibody from which it is descended, with respect to the hybrid-R or both hybrid-R and IGF-IR.

Such a functional fragment will contain at the minimum 5 amino acids, preferably 10, 15, 25, 50 and 100 consecutive amino acids of the sequence of the antibody from which it is descended.

Preferably, these functional fragments will be fragments of Fv, scFv, Fab, $F(ab')_2$, F(ab'), scFv-Fc, scFV-CH_3 type or diabodies, which generally have the same specificity of binding as the antibody from which they are descended. According to the present invention, antibody fragments of the invention can be obtained starting from antibodies such as described above by methods such as digestion by enzymes, such as pepsin or papain and/or by cleavage of the disulfide bridges by chemical reduction. In another manner, the antibody fragments comprised in the present invention can be obtained by techniques of genetic recombination likewise well known to the person skilled in the art or else by peptide synthesis by means of, for example, automatic peptide synthesizers such as those supplied by the company Applied Biosystems, etc.

According another aspect, the present invention concerns the antibody, or one of its functional fragments, as described above, said antibody being characterized in that it is also capable of binding the IGF-IR and inhibiting the binding of its native ligands, preferably designated herein as IGF1 and/or IGF2, and/or capable of specifically inhibiting the tyrosine kinase activity of said IGF-IR.

In a more preferred manner, the invention comprises the antibodies, or their functional fragments, according to the present invention, especially chimeric or humanized antibodies, obtained by genetic recombination or by chemical synthesis.

In a preferred embodiment, a subject of the invention is an antibody, or one of its functional fragments, according to the invention, characterized in that it comprises a heavy chain comprising at least one CDR chosen from the CDRs of sequence SEQ ID Nos. 8, 10 and 12 or a sequence having at least 80% identity after optimum alignment with the sequence SEQ ID Nos. 8, 10 and 12.

Among the six short CDR sequences, the third CDR of the heavy chain (CDRH3) has a greater size variability (greater diversity essentially due to the mechanisms of arrangement of the genes which give rise to it). It can be as short as 2 amino acids although the longest size known is 26. Functionally, CDRH3 plays a role in part in the determination of the specificity of the antibody (Segal et al., PNAS, 71:4298-4302, 1974; Amit et al., Science, 233:747-753, 1986; Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901-917, 1987; Chothia et al., Nature, 342:877-883, 1989; Caton et al., J. Immunol., 144:1965-1968, 1990; Sharon et al., PNAS, 87:4814-4817, 1990; Sharon et al., J. Immunol., 144:4863-4869, 1990; Kabat et al., J. Immunol., 147:1709-1719, 1991).

It is known that only a low percentage of the amino acids of the CDRs contribute to the construction of an antibody binding site, but these residues must be maintained in a very specific tridimensional conformation.

In a more preferred manner, the present invention relates to an antibody or one of its functional fragments, according to the invention, characterized in that it comprises a heavy chain comprising at least two of the three CDRs or the three CDRs of sequence SEQ ID Nos. 8, 10 and 12, or at least two of three CDRs or three CDRs of sequence respectively having at least 80% identity after optimum alignment with the sequence SEQ ID Nos. 8, 10 and 12.

In a likewise preferred embodiment, a subject of the invention is an antibody or one of its functional fragments, according to the invention, characterized in that it comprises a light chain comprising at least one CDR chosen from the CDRs of sequence SEQ ID Nos. 2, 4 and 6, or a CDR whose sequence has at least 80% identity after optimum alignment with the sequence SEQ ID Nos. 2, 4 and 6.

In a more preferred embodiment, a subject of the invention is an antibody or one of its functional fragments according to the invention, characterized in that it comprises a light chain comprising at least two of the three CDRs or the three CDRs of sequence SEQ ID Nos. 2, 4 and 6, or at least two of three CDRs or three CDRs of sequence respectively having at least 80% identity after optimum alignment with the sequence SEQ ID Nos. 2, 4 and 6.

In a more preferred manner, the antibody or one of its functional fragments according to the invention is characterized in that it comprises a heavy chain comprising the three CDRs of sequence SEQ ID Nos. 8, 10 and 12, or three CDRs of sequence respectively having at least 80% of identity after optimum alignment with the sequence SEQ ID No. 8, 10 and 12 and in that it moreover comprises a light chain comprising the three CDRs of sequence SEQ ID Nos. 2, 4 and 6, or three CDRs of sequence respectively having at least 80% of identity after optimum alignment with the sequence SEQ ID Nos. 2, 4 and 6.

According to another aspect, a subject of the present invention is an antibody or one of its functional fragments, according to the invention, characterized in that it does not attach or it does not attach in a significant manner to the human IR.

In a preferred manner, said functional fragments according to the present invention will be chosen from the fragments Fv, scFv, Fab, $(Fab')_2$, Fab', scFv-Fc, scFV-CH_3 or diabodies, or any functional fragment whose half-life would have been increased by a chemical modification, especially by PEGylation, or by incorporation in a liposome.

According to another aspect, the invention relates to a murine hybridoma capable of secreting a monoclonal antibody according to the present invention, especially the hybridoma of murine origin such as deposited at the Centre National de Culture De Microorganisme (CNCM, National Center of Microorganism Culture) (Institut Pasteur, Paris, France) on September 19, 2001 under the number I-2717.

The monoclonal antibody here called 7C10, or one of its functional fragments, characterized in that said antibody is secreted by the hybridoma deposited at the CNCM on September 19, 2001 under the number I-2717 is, of course, part of the present invention.

In a particular embodiment, the present invention relates to a murine antibody, or one of its functional fragments, according to the invention, characterized in that said antibody comprises a light chain of sequence comprising the amino acid sequence SEQ ID No. 54, or a sequence having at least 80% identity after optimum alignment with the sequence SEQ ID No. 54, or/and in that it comprises a heavy chain of sequence comprising the amino acid sequence SEQ ID No. 69, or a sequence having at least 80% identity after optimum alignment with the sequence SEQ ID No. 69.

According to a likewise particular aspect, the present invention relates to a chimeric antibody, or one of its functional fragments, according to the invention, characterized in that said antibody moreover comprises the light chain and heavy chain constant regions derived from an antibody of a species heterologous to the mouse, especially man, and in a preferred manner in that the light chain and heavy chain constant regions derived from a human antibody are respectively the kappa or lambda and gamma-1, gamma-2 or gamma-4 region.

According to a likewise particular aspect, the present invention relates to a humanized antibody or one of its functional fragments, according to the invention, characterized in that said antibody comprises a light chain and/or a heavy chain in which the skeleton segments FR1 to FR4 (such as defined below in examples 12 and 13, in tables 5 and 6) of said light chain and/or heavy chain are respectively derived from skeleton segments FR1 to FR4 of human antibody light chain and/or heavy chain.

According to a preferred embodiment, the humanized antibody or one of its functional fragments, according to the present invention is characterized in that said humanized antibody comprises a light chain comprising the amino acid sequence SEQ ID No. 61 or 65, or a sequence having at least 80% identity after optimum alignment with the sequence SEQ ID No. 61 or 65, or/and in that it comprises a heavy chain comprising the amino acid sequence SEQ ID No. 75, 79 or 83, or a sequence having at least 80% identity after optimum alignment with the sequence SEQ ID No. 75, 79 or 83.

Preferably, the humanized antibody, or one of its functional fragments, according to the invention is characterized in that said humanized antibody comprises a light chain comprising the amino acid sequence SEQ ID No. 65, and in that it comprises a heavy chain of sequence comprising the amino acid sequence SEQ ID No. 79 or 83, preferably SEQ ID No. 83.

According to a novel aspect, the present invention relates to an isolated nucleic acid, characterized in that it is chosen from the following nucleic acids:

a) a nucleic acid, DNA or RNA, coding for an antibody, or one of its functional fragments, according to the invention;

b) a complementary nucleic acid of a nucleic acid such as defined in a); and

c) a nucleic acid of at least 18 nucleotides capable of hybridizing under conditions of great stringency with at least one of the CDRs of nucleic acid sequence

SEQ ID No. 1, 3, 5, 7, 9 or 11, or with a sequence having at least 80%, preferably 85%, 90%, 95% and 98%, identity after optimum alignment with the sequence SEQ ID No. 1, 3, 5, 7, 9 or 11.

By nucleic acid, nucleic or nucleic acid sequence, polynucleotide, oligonucleotide, polynucleotide sequence, nucleotide sequence, terms which will be employed indifferently in the present invention, it is intended to indicate a precise linkage of nucleotides, which are modified or unmodified, allowing a fragment or a region of a nucleic acid to be defined, containing or not containing unnatural nucleotides, and being able to correspond just as well to a double-stranded DNA, a single-stranded DNA as to the transcription products of said DNAs.

It must also be understood here that the present invention does not concern the nucleotide sequences in their natural chromosomal environment, that is to say in the natural state. It concerns sequences which have been isolated and/or purified, that is to say that they have been selected directly or indirectly, for example by copy, their environment having been at least partially modified. It is thus likewise intended to indicate here the isolated nucleic acids obtained by genetic recombination by means, for example, of host cells or obtained by chemical synthesis.

By nucleic sequences having a percentage of identity of at least 80%, preferably 85%, 90%, 95% and 98%, after optimum alignment with a preferred sequence, it is intended to indicate the nucleic sequences having, with respect to the reference nucleic sequence, certain modifications such as, in particular, a deletion, a truncation, an elongation, a chimeric fusion and/or a substitution, especially point substitution. It preferably concerns sequences in which the sequences code for the same amino acid sequences as the reference sequence, this being connected to the degeneracy of the genetic code, or complementary sequences which are capable of hybridizing specifically with the reference sequences, preferably under conditions of high stringency, especially such as defined below.

A hybridization under conditions of high stringency signifies that the temperature conditions and ionic strength conditions are chosen in such a way that they allow the maintenance of the hybridization between two fragments of complementary DNA. By way of illustration, conditions of high stringency of the hybridization step for

the purposes of defining the polynucleotide fragments described above are advantageously the following.

The DNA-DNA or DNA-RNA hybridization is carried out in two steps: (1) prehybridization at 42°C for 3 hours in phosphate buffer (20 mM, pH 7.5) containing 5 x SSC (1 x SSC corresponds to a 0.15 M NaCl + 0.015 M sodium citrate solution), 50% of formamide, 7% of sodium dodecyl sulfate (SDS), 10 x Denhardt's, 5% of dextran sulfate and 1% of salmon sperm DNA; (2) actual hybridization for 20 hours at a temperature dependent on the size of the probe (i.e.: 42°C, for a probe size > 100 nucleotides) followed by 2 washes of 20 minutes at 20°C in 2 x SSC + 2% of SDS, 1 wash of 20 minutes at 20°C in 0.1 x SSC + 0.1% of SDS. The last wash is carried out in 0.1 x SSC + 0.1% of SDS for 30 minutes at 60°C for a probe size > 100 nucleotides. The hybridization conditions of high stringency described above for a polynucleotide of defined size can be adapted by the person skilled in the art for oligonucleotides of greater or smaller size, according to the teaching of Sambrook et al. (1989, Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor).

The invention likewise relates to a vector comprising a nucleic acid according to the present invention.

The invention aims especially at cloning and/or expression vectors which contain a nucleotide sequence according to the invention.

The vectors according to the invention preferably contain elements which allow the expression and/or the secretion of the nucleotide sequences in a determined host cell. The vector must therefore contain a promoter, signals of initiation and termination of translation, as well as appropriate regions of regulation of transcription. It must be able to be maintained in a stable manner in the host cell and can optionally have particular signals which specify the secretion of the translated protein. These different elements are chosen and optimized by the person skilled in the art as a function of the host cell used. To this effect, the nucleotide sequences according to the invention can be inserted into autonomous replication vectors in the chosen host, or be integrative vectors of the chosen host.

Such vectors are prepared by methods currently used by the person skilled in the art, and the resulting clones can be introduced into an appropriate host by standard methods, such as lipofection, electroporation, thermal shock, or chemical methods.

The vectors according to the invention are, for example, vectors of plasmidic or viral origin. They are useful for transforming host cells in order to clone or to express the nucleotide sequences according to the invention.

The invention likewise comprises the host cells transformed by or comprising a vector according to the invention.

The host cell can be chosen from prokaryotic or eukaryotic systems, for example bacterial cells but likewise yeast cells or animal cells, in particular mammalian cells. It is likewise possible to use insect cells or plant cells.

The invention likewise concerns animals, except man, which comprise at least one cell transformed according to the invention.

According to another aspect, a subject of the invention is a process for production of an antibody, or one of its functional fragments according to the invention, characterized in that it comprises the following stages:

a) culture in a medium and appropriate culture conditions of a host cell according to the invention; and

b) the recovery of said antibodies, or one of their functional fragments, thus produced starting from the culture medium or said cultured cells.

The cells transformed according to the invention can be used in processes for preparation of recombinant polypeptides according to the invention. The processes for preparation of a polypeptide according to the invention in recombinant form, characterized in that they employ a vector and/or a cell transformed by a vector according to the invention, are themselves comprised in the present invention. Preferably, a cell transformed by a vector according to the invention is cultured under conditions which allow the expression of said polypeptide and said recombinant peptide is recovered.

As has been said, the host cell can be chosen from prokaryotic or eukaryotic systems. In particular, it is possible to identify nucleotide sequences according to the invention, facilitating secretion in such a prokaryotic or eukaryotic system. A vector according to the invention carrying such a sequence can therefore advantageously be

used for the production of recombinant proteins, intended to be secreted. In effect, the purification of these recombinant proteins of interest will be facilitated by the fact that they are present in the supernatant of the cell culture rather than in the interior of the host cells.

It is likewise possible to prepare the polypeptides according to the invention by chemical synthesis. Such a preparation process is likewise a subject of the invention. The person skilled in the art knows the processes of chemical synthesis, for example the techniques employing solid phases (see especially Steward et al., 1984, Solid phase peptide synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2nd ed., (1984)) or techniques using partial solid phases, by condensation of fragments or by a classical synthesis in solution. The polypeptides obtained by chemical synthesis and being able to contain corresponding unnatural amino acids are likewise comprised in the invention.

The antibodies, or one of their functional fragments, capable of being obtained by a process according to the invention are likewise comprised in the present invention.

According to a second embodiment, the present invention concerns an antibody according to the invention such as described further above, characterized in that it is, moreover, capable of binding specifically to the human epidermal growth factor receptor EGFR and/or capable of specifically inhibiting the tyrosine kinase activity of said EGFR.

In a general manner, the growth factors are small proteins involved in the regulation of the proliferation and of the differentiation of normal cells. Some of these growth factors likewise play an important role in the initiation and the maintenance of cell transformation, being able to function as autocrine or paracrine factors. This is especially the case, in addition to the IGF1 described further above, for the epidermal growth factor EGF, which seems particularly involved in the appearance of the tumor phenotype, the progression of tumors and the generation of metastases.

EGF and IGF1 exert their action through the intermediary of their respective receptor here called EGFR and hybrid-R or both hybrid-R with IGF-IR. It concerns in the two cases membrane receptors with tyrosine kinase activity whose overexpression is described in numerous cancers. It must, however, be noted that the interaction of these two receptors is not clearly established and that the studies carried out by various teams

in this connection give contradictory results as to the collaboration of these two receptors.

Studies carried out on prostate tumor cells show that the interruption of the autocrine loop EGF/EGFR by an anti-EGFR monoclonal antibody (here called "MAB" or "MAb") is manifested by a complete loss of the response of the DU145 cells to IGF1 (Connolly J.M. and Rose D.P., Prostate, Apr. 24(4):167-75, 1994; Putz T. et al., Cancer Res., Jan. 1, 59(1):227-33, 1999). These results would suggest that a blockage of the receptor for the EGF would be sufficient in order to obtain a total inhibition of the transformation signals generated by the activation of the three receptors (EGFR, hybrid-R and IGF-IR). On the other hand, other studies (Pietrzkowski et al., Cell Growth Differ, Apr., 3(4):199-205, 1992; Coppola et al., Mol Cell Biol., Jul., 14(7):4588-95, 1994) have shown that an over-expression of EGFR necessitates the presence of a functional IGF-IR in order to exert its mitogenic and transformant potential, although IGF-IR does not necessitate, for its part, the presence of functional EGFR in order to mediate its action. This second series of studies would be more in agreement with a strategy tending preferentially to block hybrid-R or hybrid-R with IGF-IR with the aim of simultaneously affecting the two receptors.

In a surprising manner, the inventors have, firstly, demonstrated that a coinhibition of the attachment of the IGF1 and/or IGF2 and/or insulin to the hybrid-R or both the attachment of the IGF1 and/or IGF2 and/or insulin to the hybrid-R with the attachement of the IGF1 and/or IGF2 to the IGF-IR and of the attachment of the EGF to the EGFR allows a significant synergy of action of these two actions to be obtained against the *in vivo* tumor growth in nude mice carrying a tumor expressing these three receptors. One of the more probable hypotheses which is able to explain this synergy of action is that the two growth factors EGF and IGF1 (and/or IGF2) themselves act in synergy in the transformation of normal cells to cells with tumoral character and/or in the growth and/or the proliferation of tumor cells for certain tumors, especially for those overexpressing, or with an abnormal activation of, the three receptors EGFR,hybrid-R and IGF-IR and/or having an overactivation of the transduction signal mediated by these three receptors, in particular at the level of the tyrosine kinase activity of these receptors.

According to a preferred aspect of this embodiment, the invention concerns an antibody such as described further above, characterized in that it consists of a bispecific antibody comprising a second motif specifically inhibiting the attachment of the EGF to the EGFR and/or specifically inhibiting the tyrosine kinase activity of said EGFR.

The term "second motif" is intended to indicate above especially a sequence of amino acids comprising a fragment capable of specifically binding to EGFR, in particular a CDR region of a variable chain of an anti-EGFR antibody, or one of the fragments of this CDR region of sufficient length in order to exert this specific binding, or else several CDR regions of an anti-EGFR antibody.

The bispecific or bifunctional antibodies form a second generation of monoclonal antibodies in which two different variable regions are combined in the same molecule (Hollinger and Bohlen, 1999, Cancer and metastasis rev., 18:411-419). Their use has been demonstrated both in the diagnostic field and in the therapy field from their capacity to recruit new effector functions or to target several molecules on the surface of tumor cells. These antibodies can be obtained by chemical methods (Glennie MJ et al., 1987, J. Immunol., 139:2367-2375; Repp R. et al., 1995, J. Hemat., 377-382) or somatic methods (Staerz U.D. and Bevan M.J., 1986, PNAS 83:1453-1457; Suresh M.R. et al., 1986, Method Enzymol., 121:210-228) but likewise and preferentially by genetic engineering techniques which allow the heterodimerization to be forced and thus facilitate the process of purification of the antibody sought (Merchand et al., 1998, Nature Biotech., 16:677-681).

These bispecific antibodies can be constructed as entire IgG, as bispecific Fab'2, as Fab'PEG or as diabodies or else as bispecific scFv but likewise as a tetravalent bispecific antibody or two attachment sites are present for each antigen targeted (Park et al., 2000, Mol. Immunol., 37(18):1123-30) or its fragments as described further above.

In addition to an economic advantage from the fact that the production and the administration of a bispecific antibody are less onerous than the production of two specific antibodies, the use of such bispecific antibodies has the advantage of reducing the toxicity of the treatment. This is because the use of a bispecific antibody allows the total quantity of circulating antibodies to be reduced and, consequently, the possible toxicity.

In a preferred embodiment of the invention, the bispecific antibody is a bivalent or tetravalent antibody.

In practice, the interest in using a tetravalent bispecific antibody is that it has a greater avidity in comparison with a bivalent antibody on account of the presence of three attachment sites for each target, respectively IGF-IR, hybrid-R and EGFR in the present invention.

In a similar manner to the selection of the functional fragments of the anti-hybrid-R or both anti-hybrid-R and anti-IGF-IR antibody described above, said second motif is selected from the fragments Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fab', scFv, scFv-Fc, scFv-CH_3 and the diabodies, or any form whose half-life would have been increased like the pegylated fragments such as Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, $F(ab')_2$-PEG or Fab'-PEG. According to an even more preferred aspect of the invention, said second anti-EGFR motif is descended from the mouse monoclonal antibody 225, its mouse-man chimeric derivative C225, or a humanized antibody derived from this antibody 225.

According to yet another aspect, a subject of the invention is an antibody, or one of its functional fragments, according to the invention as a medicament, preferably a humanized antibody such as defined above. Antibody, for the remainder of the present description, must be understood as an i) anti-hybrid-R or ii) both anti-hybrid-R and anti-IGF-IR antibody as well as a bispecific anti-hybrid-R/EGFR or both anti-hybrid-R and anti-IGF-IR/EGFR antibody.

The invention likewise concerns a pharmaceutical composition comprising by way of active principle a compound consisting of or comprising an antibody, or one of its functional fragments according to the invention, preferably mixed with an excipient and/or a pharmaceutically acceptable vehicle.

According to yet another embodiment, the present invention likewise concerns a pharmaceutical composition such as described further above which comprises a second compound chosen from the compounds capable of specifically inhibiting the attachment of the EGF to the human epidermal growth factor receptor EGFR and/or capable of specifically inhibiting the tyrosine kinase activity of said EGFR.

In a preferred aspect of the invention, said second compound is chosen from the isolated anti-EGFR antibodies, or their functional fragments, capable of inhibiting by competition the attachment of the EGF to the EGFR. More particularly, said anti-EGFR

antibody is chosen from the monoclonal, chimeric or humanized anti-EGFR antibodies, or their functional fragments. Even more particularly, said functional fragments of the anti-EGFR antibody are chosen from the fragments Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fab', scFv-Fc, scFv-CH_3 or diabodies, or any fragment whose half-life would have been increased, like pegylated fragments. Said antibody can consist, in an even more preferred manner, of the mouse monoclonal antibody 225, its mouse-man chimeric derivative C225 (also called IMC-C225) or a humanized antibody derived from this antibody 225.

Another complementary embodiment of the invention consists in a composition such as described above which comprises, moreover, as a combination product for simultaneous, separate or sequential use, a cytotoxic/cytostatic agent and/or an inhibitor of the tyrosine kinase activity respectively of the receptors for IGF1 and/or for EGF, a corticosteroid agent, an anti-emetic agent, a cancer vaccine, an analgesic agent, an anti-vascular agent and/or an anti-proliferative agent. Such agents will be described in more details herinafter in the present specification.

"Simultaneous use" is understood as meaning the administration of the two compounds of the composition according to the invention in a single and identical pharmaceutical form.

"Separate use" is understood as meaning the administration, at the same time, of the two compounds of the composition according to the invention in distinct pharmaceutical forms.

"Sequential use" is understood as meaning the successive administration of the two compounds of the composition according to the invention, each in a distinct pharmaceutical form.

In a general fashion, the composition according to the invention considerably increases the efficacy of the treatment of cancer. In other words, the therapeutic effect of the anti-hybrid-R or both anti-hybrid-R and anti-IGF-IR antibody according to the invention is potentiated in an unexpected manner by the administration of a cytotoxic agent. Another major subsequent advantage produced by a composition according to the invention concerns the possibility of using lower efficacious doses of active principle, which allows the risks of appearance of secondary effects to be avoided or to be reduced, in particular the effects of the cytotoxic agent.

In addition, this composition according to the invention would allow the expected therapeutic effect to be attained more rapidly.

In a particularly preferred embodiment, said composition as a combination product according to the invention is characterized in that said cytotoxic/ cytostatic agent is chosen from the agents interacting with DNA, the antimetabolites, the topoisomerase I or II inhibitors, or else the spindle inhibitor or stabilizer agents or else any agent capable of being used in chemotherapy. Such cytotoxic/cytostatic agents, for each of the aforesaid classes of cytotoxic agents, are, for example, cited in the 2001 edition of VIDAL, on the page devoted to the compounds attached to the cancerology and hematology column "Cytotoxics", these cytotoxic compounds cited with reference to this document are cited here as preferred cytotoxic agents.

In a particularly preferred embodiment, said composition as a combination product according to the invention is characterized in that said cytotoxic agent is coupled chemically to said antibody for simultaneous use.

In a particularly preferred embodiment, said composition according to the invention is characterized in that said cytotoxic/cytostatic agent is chosen from the spindle inhibitor or stabilizer agents, preferably vinorelbine and/or vinflunine and/or vincristine.

Immunoliposomes are liposomes capable of vehicling compounds, such as cytotoxic and/or cytostatic agents, such as described above, and of addressing them to tumor cells by means of antibodies or of antibody fragments attached to their surface. The antibodies or antibody fragments used are directed against antigens overexpressed at the surface of tumor cells and/or surface antigens the expression of which is restricted to tumor cells. They are preferably directed against tyrosine kinase receptors, and more particularly against the receptors for IGF-I, EGF or else VEGF. A preferred antibody is a monoclonal or polyclonal, preferably monoclonal, or even humanized, antibody which will recognize the hybrid-R or both the hybrid-R and the IGF-IR specifically and with high affinity. Even more preferably, this antibody consists of the antibody which is the subject of the present invention.

The use of immunoliposomes for inhibiting tumor cell growth has been described in the literature. By way of example, mention may be made of the immunoliposomes which target proteins, such as ErbB2 (Hurwitz E. et al., Cancer

Immunol. Immunother, 49:226-234, 2000; Park J.W. et al., Clinical Cancer Res., 8:1172-1181, 2002) or EGFR (Harding J.A. et al., Biochim. Biophys. Acta, 1327:181-192, 1997), or glycolipids such as the ganglioside GD2 (Pastorino F. et al., Cancer Res., 63:86-92, 2003).

Immunoliposomes combine the advantages of liposomes and of immunoconjugates. Liposomes in fact make it possible to encapsulate cytotoxic and/or cytostatic agents and thus to protect them against degradation. They also have the advantage of decreasing the toxicity of the vehiculed agents and of reducing the side effects that they induce. They may thus allow the use of agents which are much more toxic than the agents conventionally used in anticancer chemotherapies. The conjugation of antibodies or of antibody fragments to the surface of liposomes has the advantage of thus providing a system for specific targeting and addressing of the cytotoxic agent encapsulated in the liposome. In addition, unlike immunoconjugates, since the vehiculed agent is not covalently coupled to the antibody or to the antibody fragment, it will be completely active as soon as it is introduced into the target cell.

The antibodies or antibody fragments may be attached, without any limitation, covalently to the surface of the liposomes using conventional methods of bioconjugation. The coupling of these antibodies or of the fragments will be carried out on the lipids or lipids carrying a PEG which have been inserted into the liposomal membrane. In the case of a PEG-lipid, the coupling will be carried out on the PEG in the distal position with respect to the lipid. Liposomes carrying PEG groups (PEG-grafted liposomes) have the advantage of having longer half-lives than "naked" liposomes. By way of example, mention may be made of coupling of the antibody or of the fragment, via thiol groups, to the activated lipids or PEG-lipids exhibiting maleimide or bromoacetyl groups. The thiol groups for this type of coupling may come from 2 sources. They may be free cysteine residues introduced into a recombinant fragment of the antibody of interest, for example Fab' or scFv fragments with an additional cysteine residue, or released after enzymatic hydrolysis of the antibody of interest and controlled reduction, which is the case, for example, during the preparation of Fab' fragments from complete antibodies. Complete antibodies can also be coupled, after controlled oxidation of the oligosaccharides carried by the heavy chains, to lipids or PEG-lipids exhibiting free amine or hydrazide groups.

Since tumor cells overexpressing, or with an abnormal activation of, the hybrid-R or both the hybrid-R and the IGF-IR generally possess the property of also overexpressing EGFR, it could also prove to be advantageous to claim bispecific immunoliposomes for targeting the hybrid-R, or both the hybrid-R and the IGF-IR, with the EGFR. Similarly, monospecific liposomes to the surface of which would be grafted one of the native ligands for these three receptors, IGF1, IGF2, insulin or EGF, or bispecific liposomes, would make it possible to target the same tumor cells overexpressing, or with an abnormal activation of, at least one of these receptors. This approach has been described for the EGFR (Kullberg E.B. et al., Pharm. Res., 20:229-236, 2003) but not for the hybrid-R or both the hybrid-R and the IGF-IR.

Such immunoliposomes having antibodies anti-hybrid-R or both anti-hybrid-R and anti-IGR-IR, or fragments thereof, attached covalently to the surface of the liposomes, are comprised in the present invention.

Method for the treatment of cancer wherein such immunoliposomes are administrated to patient in need of such treatment, forms also part of the present invention.

In order to facilitate the coupling between said cytotoxic agent and said antibody according to the invention, it is especially possible to introduce spacer molecules between the two compounds to be coupled, such as poly(alkylene) glycols like polyethylene glycol, or else amino acids, or, in another embodiment, to use active derivatives of said cytotoxic agents into which would have been introduced functions capable of reacting with said antibody according to the invention. These coupling techniques are well known to the person skilled in the art and will not be expanded upon in the present description.

In another preferred embodiment, said inhibitor of the tyrosine kinase activity of the receptors for IGF1 and/or for EGF is selected from the group consisting of derived natural agents, dianilinophthalimides, pyrazolo- or pyrrolopyridopyrimidines or else quinazilines. Such inhibitory agents are well known to the person skilled in the art and described in the literature (Ciardiello F., Drugs 2000, Suppl. 1, 25-32).

Other inhibitors of EGFR can, without any limitation, consist of the anti-EGFR monoclonal antibodies C225 and 22Mab (ImClone Systems Incorporated), ABX-EGF (Abgenix/Cell Genesys), EMD-7200 (Merck KgaA) or the compounds ZD-1834, ZD-

1838 and ZD-1839 (AstraZeneca), PKI-166 (Novartis), PKI-166/CGP-75166 (Novartis), PTK 787 (Novartis), CP 701 (Cephalon), leflunomide (Pharmacia/Sugen), CI-1033 (Warner-Lambert Parke-Davis), CI-1033/PD 183, 805 (Warner-Lambert Parke-Davis), CL-387, 785 (Wyeth-Ayerst), BBR-1611 (Boehringer Mannheim GmbH/Roche), Naamidine A (Bristol-Myers Squibb), RC-3940-II (Pharmacia), BIBX-1382 (Boehringer Ingelheim), OLX-103 (Merck & Co), VRCTC-310 (Ventech Research), EGF fusion toxin (Seragen Inc.), DAB-389 (Seragen/Lilgand), ZM-252808 (Imperial Cancer Research Fund), RG-50864 (INSERM), LFM-A12 (Parker Hughes Cancer Center), WHI-P97 (Parker Hughes Cancer Center), GW-282974 (Glaxo), KT-8391 (Kyowa Hakko) or the "EGFR Vaccine" (York Medical/Centro de Immunologia Molecular).

According to yet another embodiment of the invention, the composition such as described above can likewise comprise another antibody compound directed against the extracellular domain of the HER2/neu receptor, as a combination product for simultaneous, separate or sequential use, intended for the prevention and for the treatment of cancer, especially the cancers overexpressing said HER2/neu receptor and the receptor IGF-IR and/or EGFR, such as especially cancer of the breast.

Reference can be made especially to the publications of Albanell et al. (J. of the National Cancer Institute, 93(24):1830-1831, 2001) and of Lu et al. (J. of the National Cancer Institute, 93(24):1852-1857, 2001) justifying the unexpected interest in combining an anti-HER2/neu antibody with an anti-hybrid-R or both anti-hybrid-R and anti-IGF-IR antibody according to the present invention.

In a particular manner, said anti-HER2/neu antibody of the composition according to the invention is the antibody called Trastuzumab (also called Herceptin).

The invention relates, in another aspect, to a composition characterized in that one, at least, of said antibodies, or one of their functional fragments, is conjugated with a cell toxin and/or a radioelement.

Preferably, said toxin or said radioelement is capable of inhibiting at least one cell activity of cells expressing, or with an abnormal activation of, the hybrid-R or both the hybrid-R and the IGF-IR and/or EGFR, in a more preferred manner capable of preventing the growth or the proliferation of said cell, especially of totally inactivating said cell.

Preferably also, said toxin is an enterobacterial toxin, especially Pseudomonas exotoxin A.

The radioelements (or radioisotopes) preferably conjugated to the antibodies employed for the therapy are radioisotopes which emit gamma rays and preferably iodine^{131}, yttrium^{90}, gold^{199}, palladium^{100}, copper^{67}, bismuth^{217} and antimony^{211}. The radioisotopes which emit beta and alpha rays can likewise be used for the therapy.

By toxin or radioelement conjugated to at least one antibody, or one of its functional fragments, according to the invention, it is intended to indicate any means allowing said toxin or said radioelement to bind to said at least one antibody, especially by covalent coupling between the two compounds, with or without introduction of a linking molecule.

Among the agents allowing binding in a chemical (covalent), electrostatic or noncovalent manner of all or part of the components of the conjugate, mention may particularly be made of benzoquinone, carbodiimide and more particularly EDC (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]-carbodiimide hydrochloride), dimaleimide, dithiobis-nitrobenzoic acid (DTNB), N-succinimidyl S-acetyl thio-acetate (SATA), the bridging agents having one or more phenylazide groups reacting with the ultraviolets (U.V.) and preferably N-[-4-(azidosalicylamino)butyl]-3'-(2'-pyridyldithio)-propionamide (APDP), N-succinimid-yl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP), 6-hydrazino-nicotinamide (HYNIC).

Another form of coupling, especially for the radioelements, can consist in the use of a bifunctional ion chelator.

Among these chelates, it is possible to mention the chelates derived from EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) or from DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) which have been developed for binding metals, especially radioactive metals, and immunoglobulins. Thus, DTPA and its derivatives can be substituted by different groups on the carbon chain in order to increase the stability and the rigidity of the ligand-metal complex (Krejcarek et al., 1977; Brechbiel et al., 1991; Gansow, 1991; US patent 4,831,175).

For example diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) and its derivatives, which have been widely used in medicine and in biology for a long time either in their free form, or in the form of a complex with a metallic ion, have the remarkable

characteristic of forming stable chelates with metallic ions and of being coupled with proteins of therapeutic or diagnostic interest such as antibodies for the development of radioimmunoconjugates in cancer therapy (Meases et al., 1984; Gansow et al., 1990).

Likewise preferably, said at least one antibody forming said conjugate according to the invention is chosen from its functional fragments, especially the fragments amputated of their Fc component such as the scFv fragments.

The present invention moreover comprises the use of the composition according to the invention for the preparation of a medicament.

More particularly, according to another embodiment, the invention concerns the use of an antibody, or one of its functional fragments, and/or of a composition for the preparation of a medicament intended for the prevention or for the treatment of an illness induced by an overexpression and/or an abnormal activation of the hybrid-R and/or EGFR, and/or connected with a hyperactivation of the transduction pathway of the signal mediated by the interaction of the native ligands of these receptors, preferably of IGF1, IGF2 or insulin with hybrid-R, and/or of EGF with EGFR and/or HER2/neu.

According to another embodiment, the invention concerns the use of an antibody, or one of its functional fragments, and/or of a composition for the preparation of a medicament intended for the prevention or for the treatment of an illness induced by an overexpression and/or an abnormal activation of both the hybrid-R and the IGF-IR and/or EGFR, and/or connected with a hyperactivation of the transduction pathway of the signal mediated by the interaction of the native ligands of these receptors, preferably of IGF1, IGF2 or insulin with hybrid-R, of IGF1 or IGF2 with IGF-IR and/or of EGF with EGFR and/or HER2/neu.

In the present specification, by the object of the invention "use of a product or a composition for the preparation of a medicament intended for the prevention or for the treatment of a disease", it is also comprised " a method of preventing or treatment of such disease comprising the administration of said product or composition in a patient in need of such treatment".

Preferably, said use according to the invention is characterized in that the administration of said medicament does not induce or induces only slightly secondary effects connected with inhibition of the IR, that is to say inhibition of the interaction of

the IR with its natural ligands due to the presence of said medicament, especially by a competitive inhibition connected with the attachment of said medicament to the IR.

The present invention moreover comprises the use of an antibody, or one of its functional fragments, preferably humanized, and/or of a composition according to the invention for the preparation of a medicament intended to inhibit the transformation of normal cells into cells with tumoral character, preferably IGF-dependent, especially IGF1- and/or IGF2-dependent, and/or EGF-dependent and/or HER2/neu-dependent cells.

The present invention likewise relates to the use of an antibody, or one of its functional fragments, preferably humanized, and/or of a composition according to the invention for the preparation of a medicament intended to inhibit the growth and/or the proliferation of tumor cells, preferably IGF-dependent, especially IGF1- and/or IGF2-dependent, and/or EGF-dependent and/or estrogen- dependent, and/or HER2/neu-dependent cells.

In a general manner, a subject of the present invention is the use of an antibody, or one of its functional fragments, preferably humanized, and/or of a composition according to the invention, for the preparation of a medicament intended for the prevention or for the treatment of cancer preferably expressing, or with an abnormal activation of, hybrid-R, or both hybrid-R and IGF-IR, and/or EGFR, and/or of cancer preferably having a hyperactivation of the transduction pathway of the signal mediated by the interaction between the hybrid-R and its native ligands, preferably IGF1, IGF2 and insulin and/or IGF-IR and its native ligands, preferably IGF1 and IGF2 or, for example, the overexpression of IRS1 and/or between EGFR with its native ligand, preferably EGF.

The subject of the present invention is likewise the use of an antibody, or one of its functional fragments, preferably humanized, and/or of a composition according to the invention, for the preparation of a medicament intended for the prevention or for the treatment of psoriasis, psoriasis whose epidermal hyperproliferation can be connected with the expression or the overexpression of the hybrid-R, or of both the hybrid-R and the IGF-IR, and/or EGFR, and/or with the hyperactivation of the transduction pathway of the signal mediated by the interaction of hybrid-R or both hybrid-R and IGF-IR respectively with their natural ligands (Wraight C.J. et al., Nat. Biotechnol., 2000,

18(5):521-526, Reversal of epidermal hyperproliferation in psoriasis by insulin-like growth factor I receptor antisense oligonucleotides) and/or of EGFR with its natural ligands.

Among the cancers which can be prevented and/or treated with the antibody according to the invention and able to bind (or inhibit tyrosine kinase activity) the hybrid-R, breast cancer and thyroid cancer, or any other cancer overexpressing, or with an abnormal activation of hybrid-R is preferred.

Among the cancers which can be prevented and/or treated with the antibody according to the invention and able to bind (or inhibit tyrosine kinase activity) both the hybrid-R and IGF-IR, prostate cancer, osteosarcomas, lung cancer, breast cancer, endometrial cancer, pancreatic cancer, myeloid cancer, bladder cancer, thyroid cancer, melanoma or colorectal cancer or any other cancer overexpressing, or with an abnormal activation of both hybrid-R and IGF-IR is preferred.

According to yet another aspect, a subject of the present invention is a method of diagnosis, preferably *in vitro*, of illnesses connected with an overexpression or an underexpression, preferably an overexpression, of the hybrid-R and/or EGFR starting from a biological sample in which the abnormal presence of hybrid-R and/or EGFR is suspected, characterized in that said biological sample is contacted with an antibody, or one of its functional fragments, according to the invention, it being possible for said antibody to be, if necessary, labeled.

In still another aspect, a subject of the present invention is a method of diagnosis, preferably *in vitro*, of illnesses connected with an overexpression or an underexpression, preferably an overexpression, of both the hybrid-R and the IGF-IR, and/or EGFR starting from a biological sample in which the abnormal presence of both hybrid-R and IGF-IR, and/or EGFR is suspected, characterized in that said biological sample is contacted with an antibody, or one of its functional fragments, according to the invention, it being possible for said antibody to be, if necessary, labeled.

Preferably, said illnesses connected with the overexpression, or with an abnormal activation of, of the hybrid-R or both the hybrid-R and the IGF-IR and/or EGFR in said diagnosis method will be cancers.

Said antibody, or one of its functional fragments, can be present in the form of an immunoconjugate or of a labeled antibody so as to obtain a detectable and/or quantifiable signal.

The antibodies labeled according to the invention or their functional fragments include, for example, antibodies called immunoconjugates which can be conjugated, for example, with enzymes such as peroxidase, alkaline phosphatase, α-D-galactosidase, glucose oxydase, glucose amylase, carbonic anhydrase, acetylcholinesterase, lysozyme, malate dehydrogenase or glucose 6-phosphate dehydrogenase or by a molecule such as biotin, digoxygenin or 5-bromodeoxyuridine. Fluorescent labels can be likewise conjugated to the antibodies or to their functional fragments according to the invention and especially include fluorescein and its derivatives, fluorochrome, rhodamine and its derivatives, GFP (GFP for "Green Fluorescent Protein"), dansyl, umbelliferone etc. In such conjugates, the antibodies of the invention or their functional fragments can be prepared by methods known to the person skilled in the art. They can be coupled to the enzymes or to the fluorescent labels directly or by the intermediary of a spacer group or of a linking group such as a polyaldehyde, like glutaraldehyde, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), diethylene-triaminepentaacetic acid (DPTA), or in the presence of coupling agents such as those mentioned above for the therapeutic conjugates. The conjugates containing labels of fluorescein type can be prepared by reaction with an isothiocyanate.

Other conjugates can likewise include chemoluminescent labels such as luminol and the dioxetanes, bio-luminescent labels such as luciferase and luciferin, or else radioactive labels such as iodine^{123}, iodine^{125}, iodine^{126}, iodine^{133}, bromine^{77}, technetium^{99m}, indium^{111}, indium^{113m}, gallium^{67}, gallium^{68}, ruthenium^{95}, ruthenium^{97}, ruthenium^{103}, ruthenium^{105}, mercury^{107}, mercury^{203}, rhenium^{99m}, rhenium^{101}, rhenium^{105}, scandium^{47}, tellurium^{121m}, tellurium^{122m}, tellurium^{125m}, thulium^{165}, thulium^{167}, thulium^{168}, fluorine^{18}, yttrium^{199}, iodine^{131}. The methods known to the person skilled in the art existing for coupling the therapeutic radioisotopes to the antibodies either directly or via a chelating agent such as EDTA, DTPA mentioned above can be used for the radioelements which can be used in diagnosis. It is likewise possible to mention labeling with Na[I^{125}] by the chloramine T method [Hunter W.M. and Greenwood F.C. (1962) Nature 194:495] or else with technetium^{99m} by the technique of Crockford *et al.*

(US patent 4,424,200) or attached via DTPA as described by Hnatowich (US patent 4,479,930).

Thus, the antibodies, or their functional fragments, according to the invention can be employed in a process for the detection and/or the quantification of an overexpression or of an underexpression, preferably an overexpression, or with an abnormal activation of, of the IGF-IR and/or hybrid-R and/or EGFR in a biological sample, characterized in that it comprises the following steps:

a) the contacting of the biological sample with an antibody, or one of its functional fragments, according to the invention; and

b) the demonstration of the hybrid-R, or both hybrid-R and IGF-IR, and/or EGFR/antibody complex possibly formed.

In a particular embodiment, the antibodies, or their functional fragments, according to the invention, can be employed in a process for the detection and/or the quantification of the hybrid-R, or of both the hybrid-R and the IGF-IR, and/or EGFR in a biological sample, for the monitoring of the efficacy of a prophylactic and/or therapeutic treatment of IGF- and/or EGF-dependent cancer or else of psoriasis.

More generally, the antibodies, or their functional fragments, according to the invention can be advantageously employed in any situation where the expression, or with an abnormal activation of, of the hybrid-R, or both hybrid-R and IGF-IR, and/or EGFR must be observed in a qualitative and/or quantitative manner.

Preferably, the biological sample is formed by a biological fluid, such as serum, whole blood, cells, a tissue sample or biopsies of human origin.

Any procedure or conventional test can be employed in order to carry out such a detection and/or dosage. Said test can be a competition or sandwich test, or any test known to the person skilled in the art dependent on the formation of an immune complex of antibody-antigen type. Following the applications according to the invention, the antibody or one of its functional fragments can be immobilized or labeled. This immobilization can be carried out on numerous supports known to the person skilled in the art. These supports can especially include glass, polystyrene, polypropylene, polyethylene, dextran, nylon, or natural or modified cells. These supports can be either soluble or insoluble.

By way of example, a preferred method brings into play immunoenzymatic processes according to the ELISA technique, by immunofluorescence, or radio-immunoassay (RIA) technique or equivalent.

Thus, the present invention likewise comprises the kits or sets necessary for carrying out a method of diagnosis of illnesses induced by an overexpression or an underexpression of the hybrid-R and/or EGFR or for carrying out a process for the detection and/or the quantification of an overexpression or of an underexpression of the hybrid-R and/or EGFR in a biological sample, preferably an overexpression, or with an abnormal activation of, of said receptor(s), characterized in that said kit or set comprises the following elements:

a) an antibody, or one of its functional fragments, according to the invention;

b) optionally, the reagents for the formation of the medium favorable to the immunological reaction;

c) optionally, the reagents allowing the demonstration of hybrid-R and/or EGFR/antibody complexes produced by the immunological reaction.

In a second aspect, the invention also comprises the kits or sets necessary for carrying out a method of diagnosis of illnesses induced by an overexpression or an underexpression of both the hybrid-R and the IGF-IR, and/or EGFR or for carrying out a process for the detection and/or the quantification of an overexpression or of an underexpression of both the hybrid-R and the IGF-IR, and/or EGFR in a biological sample, preferably an overexpression, or with an abnormal activation of, of said receptor(s), characterized in that said kit or set comprises the following elements:

a) an antibody, or one of its functional fragments, according to the invention;

b) optionally, the reagents for the formation of the medium favorable to the immunological reaction;

c) optionally, the reagents allowing the demonstration of hybrid-R/IGF-IR antibody and/or EGFR/antibody complexes produced by the immunological reaction.

The invention moreover relates to the use of a composition as a combination product according to the invention, for the preparation of a medicament intended for the prevention or for the treatment of cancer, especially cancers for which said cytotoxic

agent or said anti-HER2/neu antibody is generally prescribed and, especially, for which cancers the tumor cells express or overexpress the IGF-IR and/or EGFR.

A subject of the invention is likewise the use of an antibody according to the invention for the preparation of a medicament intended for the specific targeting of a biologically active compound to cells expressing or overexpressing the hybrid-R or both the hybrid-R and the IGF-IR and/or EGFR.

It is intended here by biologically active compound to indicate any compound capable of modulating, especially of inhibiting, cell activity, in particular their growth, their proliferation, transcription or gene translation.

A subject of the invention is also an *in vivo* diagnostic reagent comprising an antibody according to the invention, or one of its functional fragments, preferably labeled, especially radiolabeled, and its use in medical imaging, in particular for the detection of cancer connected with the expression or the overexpression by a cell of the hybrid-R, or both the hybrid-R and the IGF-IR, and/or EGFR.

The invention likewise relates to a composition as a combination product or to an anti-hybrid-R, or both anti-hybrid-R and anti-IGF-IR, and/or EGFR/toxin conjugate or radioelement, according to the invention, as a medicament.

Preferably, said composition as a combination product or said conjugate according to the invention will be mixed with an excipient and/or a pharmaceutically acceptable vehicle.

In the present description, pharmaceutically acceptable vehicle is intended to indicate a compound or a combination of compounds entering into a pharmaceutical composition not provoking secondary reactions and which allows, for example, facilitation of the administration of the active compound(s), an increase in its lifespan and/or in its efficacy in the body, an increase in its solubility in solution or else an improvement in its conservation. These pharmaceutically acceptable vehicles are well known and will be adapted by the person skilled in the art as a function of the nature and of the mode of administration of the active compound(s) chosen.

Preferably, these compounds will be administered by the systemic route, in particular by the intravenous route, by the intramuscular, intradermal, intraperitoneal or subcutaneous route, or by the oral route. In a more preferred manner, the composition

comprising the antibodies according to the invention will be administered several times, in a sequential manner.

Their modes of administration, dosages and optimum pharmaceutical forms can be determined according to the criteria generally taken into account in the establishment of a treatment adapted to a patient such as, for example, the age or the body weight of the patient, the seriousness of his/her general condition, the tolerance to the treatment and the secondary effects noted.

The antibody, or fragments thereof, could be use alone or in association with another antibody able to target another growth factor implied in the proliferation or dissemination of tumoral cells. It could also be used in association with a chemotherapeutic agent or another tyrosine kinase inhibitor in co-administration or in the form of an immuno-conjugate, said agent being chemical, biological and/or natural. Fragments of said antibody could also be use in bispecific antibodies obtained by recombinant mechanisms or biochemical coupling, and then associating the specificity of the above described antibody with the specificity of other antibodies able to recognise other receptors involved in the proliferation, the angiogenese or any other mechanisms involved in the tumoral development.

Particular aspect of the present invention: cytotoxic and/or cytostatic active agent coupled to an addressing system, particularly to the antibodies 7C10, C7C10 or h7C10, or fragment thereof, according to the present invention capable of binding specifically to the hybrid-R or both the hybrid-R and the IGF-IR.

The present invention relates also to novel compounds comprising a cytotoxic and/or cytostatic active agent coupled to an addressing system. More particularly, the present invention relates to a compound comprising a Vinca alkaloid coupled to an antibody capable of binding specifically to the hybrid-R or both the hybrid-R and the IGF-IR and/or capable of specifically inhibiting the tyrosine kinase activity of said hybrid-R or both hybrid-R and IGF-IR, in particular a monoclonal antibody of murine, chimeric, primatized, humanized and human origin. The invention also relates to the mode of coupling of the elements of said compound and also comprises the use of these compounds as a medicinal product for the prophylactic and/or therapeutic treatment of cancer, more particularly of cancers overexpressing hybrid-R and/or IGF-IR, or of any

pathological condition associated with overexpression, or with an abnormal activation of, of said receptor(s).

Currently, along with surgery and radiotherapy, chemotherapy represents one of the most effective means of combating cancer. Many cytotoxic and/or cytostatic agents have been isolated or synthesized and make it possible to destroy or reduce, if not definitively, at least significantly, the tumor cells. However, the toxic activity of these agents is not limited to tumor cells, and the non-tumor cells are also effected and can be destroyed. More particularly, side effects are observed on rapidly renewing cells, such as haematopoietic cells or cells of the epithelium, in particular of the mucous membranes. By way of illustration, the cells of the gastrointestinal tract are largely effected by the use of cytotoxic agents.

One of the aims of the present invention is also to be able to provide a compound which makes it possible to limit the side effects on normal cells while at the same time conserving a high cytotoxicity on tumor cells.

According to an original approach, the applicant, rather than developing new molecules, has sought to overcome the problem of toxicity of known molecules by limiting to tumor cells the access of said molecules. To do this, the applicant has developed an antibody-type addressing system for targeting only tumor cells.

One of the advantages of this approach is to be able to use known cytotoxic agents which are well defined in pharmacological and pharmacokinetic terms. In addition, it is then possible to use strong cytotoxic agents which until now have been neglected in favour of cytotoxic agents which are less strong but which have a better therapeutic index (and therefore exhibit fewer side effects).

Another advantage lies in the use of an antibody, i.e. of a product of biological origin which does not add any toxicity to that of the cytotoxic agent. In addition, as will be subsequently developed, the choice of the antibody makes it possible to accumulate with the action of the cytotoxic agent its own biological activity.

The applicant has demonstrated that the use of a Vinca alkaloid coupled to an addressing device is of value in chemotherapy.

According to a first aspect, a subject of the present invention is a compound comprising at least one molecule of active agent coupled to an addressing system, said at least one molecule of active agent being a strong cytotoxic and/or cytostatic

compound chosen from Vinca alkaloids, and said addressing system being a polyclonal or monoclonal antibody, which may be bispecific, or a functional fragment thereof, capable of targeting, preferably specifically, tumor cells.

An advantage of a compound according to the invention is that the active agent is directly brought to the target cells by the antibody and, besides the fact that it does not degrade the other cells, its biological activity is not decreased.

One of the advantages associated with using antibodies as an addressing system is that it is possible to couple several active agents to them, thus increasing the efficacy of the compound. Specifically, since the compound is brought directly to the target cells, the fact that there are several active agents will not lead to an increase in side effects, but only to an increase in the desired in situ effect on the tumor cells.

By way of non-limiting examples of targeting antibodies which can be used according to the invention, mention may be made, without any limitation, of the CeaVac antibodies directed against colorectal tumor cells, and the Y Theragyn/pemtumomab and OvaRex antibodies directed against ovarian tumor cells.

The present invention relates to a compound as described above, which comprises from 1 to 50 molecules of active agent, preferably from 1 to 10, and better still from 1 to 6. The choice of the number of molecules of active agent depends, inter alia, on the molecular weight of each of the elements. For example, by way of indication, for an antibody of IgG1 type with a molecular weight of 150 000 Da, it is preferred to couple from 4 to 6 molecules of vinblastine with a molecular weight of 900 Da (Petersen et al., Cancer Res., 1991, 51:2286). If the antibody is conjugated with too large an amount of cytotoxic agents, there is a risk that said agents will mask the recognition site for the antigen and decrease its activity.

In practice, the compound which is the subject of the invention is used as a medicinal product, and more particularly as an medicinal product intended for the treatment of cancer.

The present invention differs from the prior art not only in the sense that the choice of the antibody is aimed at targeting tumor cells as described above, but also in that said antibody exhibits an intrinsic activity on the tumor cells.

According to another embodiment of the invention, the compound as described above is also capable of inhibiting tumor cell proliferation and/or apoptotic function

restoration by blocking transduction signals, the progression of cells in the cell cycle and/or membrane-bound receptor availability (phenomena of internalization and of degradation of said receptor), or of reverting an apoptosis-resistant phenotype in the case of an antibody directed against the IGF-IR, insofar as it is widely described that overexpression of this receptor confers on tumor cells a means of withstanding apoptosis and in particular apoptosis induced by chemotherapy compounds (Beech D. J. et al., Oncology reports, 2001, 8:325-329; Grothe A. et al., J. Cancer Res. clin Oncol., 1999, 125:166-173). Another mechanism of action of the compound as described above may be associated with the Fc portion of the antibody, if a whole antibody is used, and may consist of the setting up of effector mechanisms such as ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) and CDC (complement-dependent cytotoxicity).

By way of non-limiting example of antibodies, mention may be made of Avastin/Bevacizumab which acts on colorectal cancers by interfering with tumor angiogenesis, Rituxan/rituximab, the activity of which is mainly related to the effector functions of the molecule, and in particular ADCC, and also Herceptin/trastuzumab which acts by inhibition of signal transduction and inhibition of cell progression in the cell cycle, and also, in large part, by initiating ADCC mechanisms.

Vinca alkaloids correspond to the family of natural compounds of which vinblastine, vincristine, anhydrovinblastine and leurosine, which are present in considerable amounts in plants, are demonstrative examples.

The term "Vinca alkaloids" should also be understood to mean all the derivatives present in small amounts, such as deoxyvinblastine or leurosidine, taken by way of non-limiting examples. It should also be understood to mean derivatives of natural structure but which are obtained by synthesis, such as, without any limitation, anhydrovinblastine.

The term "Vinca alkaloid" should also be understood to mean all the compounds derived from these natural compounds by chemical or biochemical modification in one or more steps. These modifications may affect the "vindoline" component or the "velbanamine" component or both components simultaneously. The Vinca alkaloids, as such, are known to those skilled in the art (Antitumor Bisindole Alkaloids from Catharanthus roseus (L.)). The Alkaloids, Brossi A. et al., M. Ed. Academic Press Inc. San Diego, vol. 37, 1990; Jacquesy J.C. et al., Biomedical Chemistry: Applying

Chemical Principles to the Understanding and Treatment of Disease, edited by Torrence, P.F., John Wiley and Sons Inc.: New York, 2000, pp. 227-246; Fahy J. et al., J. Current Pharm. Des., 2001, 7:1181-97; Duflos A. et al., Novel Aspects of Natural and Modified Vinca Alkaloids, Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents, 2002, 2:55-70).

The preferred derivatives according to the present invention are those which exhibit a pharmacological advantage established by virtue of cytotoxicity assays or activity assays on certain specific targets, such as tubulin, or which have demonstrated advantages in *in vivo* tests on animals. Among these compounds, mention may be made of the derivatives currently used in anticancer chemotherapy: vinblastine, vincristine, vindesine and vinorelbine, and also the derivatives which have demonstrated an advantage in clinical studies, such as vinepidine, vinfosiltine, vinzolidine and vinflumine.

The invention is therefore partly based on the choice of an original cytotoxic agent without any bias from the prior art.

More particularly, a subject of the present invention is a compound as described above, in which said Vinca alkaloid is selected from vinblastine, deoxyvinblastine, deoxyleurosidine, vincristine, vindesine, vinorelbine, vinepidine, vinfosiltine, vinzolidine and vinflumine.

The subject of the invention has, more specifically, been demonstrated and exemplified using deoxyvinblastine and its 4'-S isomer, commonly known as deoxyleurosidine.

The structure of each of these two compounds has been described for many years, but their pharmacological activity is considered to be moderate or weak (Neuss N. et al., Tetrahedron Letters, 1968, No. 7, pp 783-7; United States Patent 4,143,041, Eli Lilly and Company, Filed Nov. 25, 1977; and recently, Kuehne M. E. et al., J. Org. Chem., 1989, 54, 14:3407-20; Kuehne M. E., Org. Biomol. Chem., 2003 1:2120-36). Their real advantage as a compound with unquestionable antitumor pharmacological activity has never been described and demonstrated by in vivo experiments on murine tumor models.

The present invention therefore relates to a compound as described above, in which said Vinca alkaloid is (4'-R) deoxyvinblastine and/or (4'-S) deoxyleurosidine.

The greater activity of these two derivatives has been demonstrated against P388 murine leukaemia grafted intravenously on day 0. The compound is administered intraperitoneally in a single dose on day 1. The protocol for this test is described by Kruczynski A. et al., Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 1998, volume 41, pages 437 to 447.

Conventionally, the in vivo activity of cytotoxic compounds is expressed by the T/C at a dose expressed in mg per kg. The T/C corresponds to the ratio, multiplied by 100, of the median of the survival time of the treated animals to the median of the survival time of the control animals.

By way of example, for cytotoxic agents used to date, the maximum activity of vinblastine sulphate is expressed at the dose of 5 mg/kg, with T/C = 143. The maximum activity of vincristine sulphate is expressed at the doses of 1.25 and 2.5 mg/kg, with T/C = 143 in both cases.

Unexpectedly, the maximum activity of deoxyvinblastine ditartrate is expressed at the dose of 20 mg/kg, with T/C = 214 and the maximum activity of deoxyleurosidine ditartrate is expressed at the dose 2.5 mg/kg, with T/C = 200.

In view of these results, the present invention therefore relates to the use of (4'-R) deoxyvinblastine and/or (4'-S) deoxyleurosidine, collectively referred to as deoxyvinblastine in the remainder of the description, for treating cancer.

According to a preferred form, as described above, the present invention envisages the coupling of deoxyvinblastine to a compound of the monoclonal or polyclonal, preferably monoclonal, antibody type.

More particularly, as will subsequently be described, a preferred antibody making up the compound which is the subject of the present invention is a monoclonal or polyclonal, preferably monoclonal, antibody which will recognize the IGF-IR specifically and with high affinity, and which will have the ability to inhibit the growth of tumors, more particularly of tumors expressing the IGF-IR.

The cytoplasmic protein tyrosine kinases are activated by binding of the ligand to the extracellular domain of the receptor. Activation of the kinases leads, in turn, to stimulation of various intracellular substrates, including IRS-1, ISR-2, Shc and Grb 10 (Peruzzi F. et al., J. Cancer Res. Clin. Oncol., 125:166-173, 1999). The two major substrates for the IGF-IR are IRS and Shc, which mediate, by activation of many

downstream effectors, most of growth and differentiation effects associated with the binding of IGFs to this receptor. Substrate availability can, consequently, dictate the final biological effect associated with activation of the IGF-IR. When IRS-1 predominates, the cells tend to proliferate and to transform. When Shc dominates, the cells tend to differentiate (Valentinis B. et al., J. Biol. Chem., 274:12423-12430, 1999). It appears that the pathway mainly implicated for the effects of protection against apoptosis is the phosphatidylinositol 3-kinases (PI 3-kinases) pathway (Prisco M. et al., Horm. Metab. Res., 31:80-89, 1999; Peruzzi F. et al., J. Cancer Res. Clin. Oncol., 125:166-173, 1999).

According to a preferred embodiment, a subject of the present invention is a compound as described above (cytotoxic and/or cytostatic active agent coupled to an addressing system), comprising an antibody capable of recognizing the IGF-IR specifically and with high affinity. This antibody will interact little or not at all with the insulin receptor IR. Its binding should inhibit, in vitro, the growth of tumors expressing the IGF-IR by interacting mainly with the signal transduction pathways activated during IGF1/IGF-IR and IGF2/IGF-IR interactions. This antibody should be active in vivo on all tumor types expressing the IGF-IR, including oestrogen-dependent breast tumors and prostate tumors, which is not the case for the anti-IGF-IR monoclonal antibodies (referred to as MAb or MAB) currently available. In fact, αIR3, which is a reference in the IGF-IR field, completely inhibits the growth of oestrogen-dependent breast tumors (MCF-7) in vitro, but has no effect on the corresponding in vivo model (Artega C. et al., J. Clin. Invest., 84:1418-1423, 1989). Similarly, the scFv-Fc fragment derived from the murine monoclonal 1H7 is only weakly active on the MCF-7 breast tumor and completely inactive on an androgen-independent prostate tumor (Li S.L. et al., Cancer Immunol. Immunother., 49:243-252, 2000).

According to a preferred embodiment, a subject of the present invention is a compound (cytotoxic and/or cytostatic active agent coupled to an addressing system) as described above, comprising an antibody, or one of its functional fragments, said antibody or one of its said fragments being capable of binding specifically to the human insulin-like growth factor-I receptor IGF-IR and, where appropriate, capable of

inhibiting the natural binding of the IGF-IR ligands IGF1 and/or IGF2, and/or capable of specifically inhibiting the tyrosine kinase activity of said IGF-IR.

Such a compound has a double advantage.

Firstly, it makes it possible, as described above, to bring the cytotoxic agent directly to tumor cells, more particularly tumor cells overexpressing, or with an abnormal activation of, the hybrid-R or both the hybrid-R and the IGF-IR, and thus to decrease the side effects in normal cells.

Secondly, its mode of action is not limited to targeting. The compound which is the subject of the present invention cumulates the action of the cytotoxic agent which makes it possible to destroy the tumor cells and the action of the antibody which will inhibit the growth of tumor cells, preferably of tumor cells expressing, or with an abnormal activation of, the hybrud-R or both the hybrid-R and the IGF-IR, by interacting with the signal transduction pathways, and will make it possible to decrease the resistance to apoptosis of cells overexpressing the receptor for IGF1 and, consequently, to improve the activity of chemotherapy drugs, part of the mechanism of action of which lies in the induction of apoptosis.

According to a preferred embodiment of the compound (cytotoxic and/or cytostatic active agent coupled to an addressing system) which is the subject of this particularly object of the present invention, the monoclonal antibody, or one of its functional fragments, is the 7C10, a C7C10 or a h7C10, or fragment thereof, or their derived antibodies, as described in the first part of the present specification directed to the antibodies anti-hybrid-R or both anti-hybrid-R and anti-IGR-IR of the present invention.

In this respect, the applicant filed a French patent application FR 03/08538 on July 11, 2003 for "Novel antitumor immunoconjugates". The content of this patent application is incorporated herein by way of reference.

Immunoliposomes containing such particular cytotoxic and/or cytostatic agents, such as described above,such as the vinca alkaloids, and of addressing them to tumor cells by means of antibodies or of antibody fragments attached to their surface are comprised in the present invention.

Method of treatement of cancer, particularly the preferred cancers cited above, comprising the administration of the present immunoliposomes forms also part of the present invention.

The antibodies or antibody fragments used are directed against antigens overexpressed at the surface of tumor cells and/or surface antigens the expression of which is restricted to tumor cells. They are preferably directed against tyrosine kinase receptors, and more particularly against the receptors for IGF-I, EGF or else VEGF. A preferred antibody is a monoclonal or polyclonal, preferably monoclonal, or even humanized, antibody which will recognize the hybrid-R, or both the hybrid-R and the IGF-IR, specifically and with high affinity. Even more preferably, this antibody consists of the antibody anti-hybrid-R or both anti-hybrid-R and anti-IGR-IR which is the subject of the present invention described in the first part of the specification.

According to another embodiment of the compound (cytotoxic and/or cytostatic active agent coupled to an addressing system) which is a subject of the present invention, the monoclonal antibody as described above is also capable of binding specifically to the human epidermal growth factor receptor, EGFR, and/or capable of specifically inhibiting the tyrosine kinase activity of said EGFR.

According to a preferred aspect of this embodiment of the compound(cytotoxic and/or cytostatic active agent coupled to an addressing system), the coupled monoclonal antibody consists of a bispecific antibody comprising a second unit which specifically inhibits the binding of EGF to the EGFR and/or which specifically inhibits the tyrosine kinase activity of said EGFR.

In a preferred embodiment of the invention, the bispecific antibody which can be used here for cytotoxic and/or cytostatic active agent coupled to an addressing system according to this invention is those as described in the first part of the presnt specification related to bispecific antibodies of the invention.

Another aspect of the invention concerns the mode of coupling between the antibody and the cytotoxic agent. Whatever the nature of the coupling, which may be direct or indirect, stable or labile, it should in no way impair the respective biological functions of the antibody and of the cytotoxic agent. It is clearly understood that any coupling satisfying this characteristic, and known to those skilled in the art, is included in the scope of the present patent application. In addition, the coupling, and more

particularly the linkage used, must allow release of the deoxyvinblastine, in the 4-deacetylated or 3-acid, or 4-deacetylated and 3-acid, form, or in the form of one of these forms carrying all or part of said linkage used, in the target cells.

According to a preferred embodiment, the coupling is chemical coupling. More particularly, said chemical coupling is composed of an anchorage on the Vinca alkaloid, an anchorage on the antibody and a linkage connecting these two anchorages.

The term "linkage" should be understood to mean any structure capable of providing a bond of whatever possible nature between the two elements of the compound, namely a chemical molecule and an antibody.

In terms of the anchorage on the Vinca alkaloid, several possibilities are envisaged. Mention may, for example, be made of an anchorage on the alcohol function in the 4-position after deacetylation of the 4-acetoxy group of said Vinca alkaloid.

In another embodiment, the anchorage on the Vinca alkaloid is effected on the acid function in the 3-position after deacetylation of the 4-acetoxy group and demethylation of the ester function in the 3-position of said Vinca alkaloid.

According to yet another embodiment of the invention, the anchorage on the Vinca alkaloid is effected on the acid function in the 3-position directly by reaction on the ester function in the 3-position of said Vinca alkaloid.

According to yet another embodiment of the invention, the anchorage on the Vinca alkaloid is effected via an ester or thioester function on the hydroxyl function in the 3-position.

An additional embodiment consists in effecting the anchorage on the Vinca alkaloid via an amide function or an ester function or a hydrazide function on the acid function in the 4-position.

As regards the anchorage on the antibody, it should in no way denature the antibody, so as not to decrease its ability to recognize and interact with the tumor cells.

To do this, it is preferable for the anchorage on the antibody to be effected on the oligosaccharides, the lysines and/or the aspartic acid and glutamic acid residues.

The Vinca alkaloid may also be coupled on the carboxylic functions of the antibody, carried by the aspartic acid and glutamic acid residues of the antibody. For example, an amine, hydrazide or hydrazine derivative of the Vinca alkaloid will be

coupled on these residues in the presence of a compound of carbodiimide type, such as N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide (or EDAC).

In practice, it is even more preferable to effect the anchorage on the oligosaccharides present on the antibody. Specifically, there are no oligosaccharides in the recognition sites of the antibody and, as a result, there is no risk of impairing the recognition/biological activity capacities of said antibody. According to a preferred embodiment of the invention, the anchorage is effected on the oligosaccharides present on the asparagines (Asn) which are followed by a consensus sequence consisting of an amino acid and a serine or a threonine. For example, without any limitation, a preferred anchorage on the IgG1 antibody used in the invention is on Asn297.

A combined anchorage, i.e. an anchorage on oligosaccharides, lyines and/or aspartic acid and glutamic acid, is also covered.

An additional embodiment consists in greatly increasing the density of the Vinca alkaloid in order to attain 10 to 50 mol per mole of antibody. Mention may be made of the coupling of a hemisuccinate derivative of the Vinca alkaloid on a lysine polymer (Poly-L-Lys or Poly-D-Lys). The conjugate thus obtained is then coupled on the oligosaccharides of the antibody, oxidized beforehand with meta-periodate.

In another embodiment, a hydrazide derivative of the Vinca alkaloid may be coupled on a dextran oxidized beforehand with meta-periodate. The conjugate obtained is then coupled to the antibody via the lysine residues.

According to yet another embodiment, a hemisuccinate derivative of the Vinca alkaloid may be coupled on a dextran activated beforehand by controlled oxidation with meta-periodate and then substituted with a compound of diamide type. The conjugate obtained is then coupled on the lysine residues of the antibody.

According to a preferred embodiment of the invention, the anchorage on the antibody is effected by reaction of an amine function, a hydrazine function, a hydrazide function or an acid function which has been activated.

More particularly, the anchorage on the antibody is effected by reaction of an epoxide function or of a disulphide function, a sulphide function or an acid function which has been activated, with a nitrogen-containing residue or with a hydroxyl residue or with a thiol residue of said antibody.

Mention may also be made, in a nonlimiting manner, of other linkages which may also be used to covalently attach the Vinca alkaloids to the antibodies or to their functional fragments (Garnett et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 2001, 171-216), such as aldehydes which make it possible to form Schiff bases, which can then be stabilized by reduction with sodium borohydride or cyanoborohydride; disulphides which have the advantage of being able to release the Vinca alkaloids inside the tumor cell by virtue of the intracytoplasmic reducing environment; more stable thioethers; more labile thioesters; linkages which are labile in acidic medium, which have the advantage of allowing release of the cytotoxic agent in the tumor, which is generally more acid, or during the passage from the endosome (pH 6.0 6.8) to the lysosome (pH 4.5 5.5), or else enzyme-degradable linkages which have the advantage of being stable in the serum and of releasing the cytotoxic agent in the intracellular medium of the tumor cell.

Mention may also be made of peptide sequences of the Ala Leu type, which can be cleaved by lysosomal hydrolases (Masquelier et al., J. Med. Chem., 1980, 23:1166-1170) or else linkages of the hydrazone type, such as those used in the gemtuzumab ozogamicin immunoconjugate used in the treatment of certain types of leukaemia and sold under the name Mylotarg (Hamann et al., Bioconjugate Chem., 2002, 13:47).

As described above, a preferred form of the invention uses a linkage which allows release of the deoxyvinblastine in the tumor cells.

A first means for achieving this consists in using a linkage connecting the two anchorages which consists of a peptide chain. In fact, such a peptide linkage will be degraded/hydrolysed in the target cells by the enzymes of the endosomes and of the lysosomes.

According to another embodiment of the invention, the linkage connecting the two anchorages consists of a linear or branched carbon-based chain. In the latter case, it is envisaged that one or more aromatic, ethylenic or acetylenic groups and also one or more ketone, amide, ester, hydrazide, hydrazone, amine, ether, sulphide or disulphide groups are included in the carbon chain in a distinct or combined manner. For example, in the case of an attachment via a disulphide bridge, it is the reducing medium which will allow cleavage of the linkage and release of the deoxyvinblastine.

In all cases, only the linkage is destroyed in order to release the active principle, said active principle and the antibody themselves remaining intact.

According to yet another embodiment, there is no linkage, but the Vinca alkaloid is coupled directly with a nitrogen-containing residue or with a hydroxyl residue or with a thiol residue of the antibody.

The advantage of such a direct coupling lies in the absence of anchorage linkage and, consequently, in the absence of an immune reaction by the patient against this linkage. The appearance of anti-linkage antibodies secreted by the body in response to the intrusion of said linkage is thus, for example, avoided.

More particularly, the compound according to the invention is characterized in that the acid function in the 4-position of the Vinca alkaloid is coupled, via a hydrazide function, with an aldehyde residue of the antibody, generated beforehand.

The invention also relates to a pharmaceutical composition comprising, as active principle, a compound comprising or consisting of a Vinca alkaloid coupled to an antibody, or one of its functional fragments, according to the invention, to which a pharmaceutically acceptable excipient and/or vehicle is preferably added.

The present invention also comprises the use of the compound according to the invention for preparing a medicinal product.

More particularly, according to another embodiment, the invention relates to the use of a compound as described above and/or of a composition comprising such a compound, for preparing a medicinal product intended for the prevention or treatment of cancers, in particular cancers induced by overexpression and/or activation, or with an abnormal activation of, of the hybrid-R, or both the hybrid-R and the IGF-IR, and/or EGFR which is abnormal, and/or associated with hyperactivation of the signal transduction pathway mediated by the interaction of IGF1, IGF2 or insulin with hybrid-R alone or in combination with the interaction of IGF1 or IGF2 with IGF-IR and/or of EGF with EGFR.

Among the cancers which may be prevented and/or treated, prostate cancer, osteosarcomas, lung cancer, breast cancer, endometrial cancer or colon cancer, or any other cancer overexpressing IGF-IR, is preferred.

According another aspect, the invention concerns a humanized anti-IGF-IR antibody, or antigen-binding fragment thereof, wherein said anti-IGF-IR antibody, or antigen-binding fragment, comprises at least one complementary determining region of non-human origin and at least one framework region having at least one human residue,

wherein said antibody is characterized as:

a) binding IGF-IR but not IR alone; and/or

b) inhibiting the binding between a human IGF-IR and its native ligand, preferably designated herein as IGF1 and/or IGF2, with an inhibition constant and/or IC_{50} of less than 100 nM, preferably less than 50 nM; and/or

c) specifically inhibiting the tyrosine kinase activity of said IGF-IR; and/or

d) having a binding affinity of 10 nM or less for said IGF-IR; and/or

e) down-regulating IGF-IR expression; and/or

f) inhibiting *in vivo* tumor growth;

wherein said antibody comprises a heavy chain amino acid sequence comprising human FR1, FR2, and FR3 amino acid sequences that correspond to those of a human germline such as, for example, the human Kabat subgroup I(A) germline, or conservative substitutions or somatic mutations therein, and/or

wherein said antibody comprises a light chain amino acid sequence comprising human FR1, FR2, and FR3 amino acid sequences that correspond to those of a human germline such as, for example, the human Kabat subgroup II germline, or conservative substitutions or somatic mutations therein, and

wherein the FR sequences of the heavy chain are linked with CDR1, CDR2, and CDR3 of sequences derived from a non-human source and comprising the amino acid sequences selected from the group consisting of SEQ ID Nos. 8, 10 and 12, and/or

wherein the FR sequences of the light chain are linked with CDR1, CDR2, and CDR3 of sequences derived from a non-human source and comprising the amino acid sequences selected from the group consisting of SEQ ID Nos. 2, 4 and 6.

In a second embodiment, the present invention also deals with a humanized anti-hybrid-R antibody or antigen-binding fragment thereof, wherein said anti-hybrid-R antibody or antigen-binding fragment comprises at least one complementary determining region of non-human origin and at least one framework region having at least one human residue, wherein said antibody is characterized as:

a) binding hybrid-R but not IR alone; and/or

b) inhibiting the binding between a human hybrid-R and its native ligand, preferably designated herein as IGF1 and/or IGF2 and/or insulin, with an inhibition constant and/or IC_{50} of less than 100 nM, preferably less than 50 nM; and/or

c) specifically inhibiting the tyrosine kinase activity of said hybrid-R; and/or

d) having a binding affinity of 10 nM or less for said hybrid-R ; and/or

e) down-regulating hybrid-R expression; and/or

f) inhibiting *in vivo* tumor growth;

wherein said antibody comprises a heavy chain amino acid sequence comprising human FR1, FR2, and FR3 amino acid sequences that correspond to those of a human germline such as, for example, the human Kabat subgroup I(A) germline, or conservative substitutions or somatic mutations therein,

wherein said antibody comprises a light chain amino acid sequence comprising human FR1, FR2, and FR3 amino acid sequences that correspond to those of a human germline such as, for example, the human Kabat subgroup II germline, or conservative substitutions or somatic mutations therein, and

wherein the FR sequences are linked with CDR1, CDR2, and CDR3 sequences derived from a non-human source and comprising the amino acid sequences selected from the group consisting of SEQ ID Nos. 8, 10 and 12, and/or

wherein the FR sequences of the light chain are linked with CDR1, CDR2, and CDR3 of sequences derived from a non-human source and comprising the amino acid sequences selected from the group consisting of SEQ ID Nos. 2, 4 and 6.

Moreover, according a third embodiment of the invention, it is envisaged a humanized anti-IGF-IR and hybrid-R antibody or antigen-binding fragment thereof, wherein said anti-IGF-IR and hybrid-R antibody or antigen-binding fragment comprises at least one complementary determining region of non-human origin and at least one framework region having at least one human residue, wherein said antibody is characterized as:

a) binding IGF-IR and hybrid-R but not IR alone; and/or

b) inhibiting the binding between a human IGF-IR and its native ligand, preferably designated herein as IGF1 and/or IGF2, with an inhibition constant and/or IC_{50} of less than 100 nM, preferably less than 50 nM, and also a human hybrid-R, and its natural ligand designated herein as IGF1 and/or IGF2 and/or insulin, with an inhibition constant and/or IC_{50} of less than 100 nM, preferably less than 50 nM; and/or

c) specifically inhibiting the tyrosine kinase activity of both said IGF-IR and hybrid-R; and/or

d) having a binding affinity of 10 nM or less for said hybrid-R and of 10 nM or less for said IGF-IR; and/or

e) down-regulating both IGF-IR and hybrid-R expression; and/or

f) inhibiting *in vivo* tumor growth;

wherein said antibody comprises a heavy chain amino acid sequence comprising human FR1, FR2, and FR3 amino acid sequences that correspond to those of a human germline such as, for example, the human Kabat subgroup I(A) germline, or conservative substitutions or somatic mutations therein, and/or

wherein said antibody comprises a light chain amino acid sequence comprising human FR1, FR2, and FR3 amino acid sequences that correspond to those of a human germline such as, for example, the human Kabat subgroup II germline, or conservative substitutions or somatic mutations therein, and

wherein the FR sequences are linked with CDR1, CDR2, and CDR3 sequences derived from a non-human source and comprising the amino acid sequences selected from the group consisting of SEQ ID Nos. 8, 10 and 12, and/or

wherein the FR sequences of the light chain are linked with CDR1, CDR2, and CDR3 of sequences derived from a non-human source and comprising the amino acid sequences selected from the group consisting of SEQ ID Nos. 2, 4 and 6.

The invention also describes a method of modulating IGF-IR activity in IGF-IR-responsive mammalian cells comprising: contacting the cells with an antibody specific for said receptor, wherein said antibody comprises a light and a heavy chain, said light chain comprising at least one complementary determining region CDR chosen from the CDRs of sequence SEQ ID Nos. 2, 4 and 6 and said heavy chain comprising at least one complementary determining region CDR chosen from the CDRs of sequence SEQ ID Nos. 8, 10, and 12.

In a second embodiment, the invention describes a method of modulating hybrid-R activity in hybrid-R-responsive mammalian cells comprising: contacting the cells with an antibody specific for said receptor, wherein said antibody comprises a light and a heavy chain, said light chain comprising at least one complementary determining region CDR chosen from the CDRs of sequence SEQ ID Nos. 2, 4 and 6 and said heavy

chain comprising at least one complementary determining region CDR chosen from the CDRs of sequence SEQ ID Nos. 8, 10, and 12.

Then, in a third embodiment, an object of the present invention is a method of jointly modulating IGF-IR and hybrid-R activities in IGF-IR and hybrid-R-responsive mammalian cells comprising: contacting the cells with an antibody specific for said receptors, wherein said antibody comprises a light and a heavy chain, said light chain comprising at least one complementary determining region CDR chosen from the CDRs of sequence SEQ ID Nos. 2, 4 and 6 and said heavy chain comprising at least one complementary determining region CDR chosen from the CDRs of sequence SEQ ID Nos. 8, 10, and 12.

More particularly, the methods above described, and wherein the antibody modulates IGF-IR activity, is directed against, without limitation, mammalian cells selected from the group consisting of breast cancer cells, prostate cancer cells, colorectal cancer cells, lung cancer cells, bladder cancer cells, kidney cancer cells, thyroid cancer cells, osteosarcomas cells, pancreatic cancer cells, melanoma and myeloid cells.

The method above descirbed, wherein the antibody modulates hybrid-R activity, is directed against, without limitation, mammalian cells selected from the group consisting of breast cancer cells or thyroid cancer cells. The same for the modulation of both hybrid-R and IGF-IR.

The invention also deals with method of decreasing IGF-IR activity in IGF-IR-responsive mammalian cells comprising: contacting the cells with an antibody specific for said receptor in an amount sufficient to decrease the activity of IGF-IR, wherein said antibody comprises a light and a heavy chain, said light chain comprising at least one complementary determining region CDR chosen from the CDRs of sequence SEQ ID Nos. 2, 4 and 6 and said heavy chain comprising at least one complementary determining region CDR chosen from the CDRs of sequence SEQ ID Nos. 8, 10, and 12.

In a similar manner than previous method, the invention concerns, in a second embodiment, a method of decreasing hybrid-R activity in hybrid-R-responsive mammalian cells comprising: contacting the cells with an antibody specific for said receptor in an amount sufficient to decrease the activity of hybrid-R, wherein said

antibody comprises a light and a heavy chain, said light chain comprising at least one complementary determining region CDR chosen from the CDRs of sequence SEQ ID Nos. 2, 4 and 6 and said heavy chain comprising at least one complementary determining region CDR chosen from the CDRs of sequence SEQ ID Nos. 8, 10, and 12.

In a third embodiment, it is envisaged a method of jointly decreasing IGF-IR and hybrid-R activities in IGF-IR and hybrid-R-responsive mammalian cells comprising: contacting the cells with an antibody specific for said receptors in an amount sufficient to decrease the activities of IGF-IR and hybrid-R, wherein said antibody comprises a light and a heavy chain, said light chain comprising at least one complementary determining region CDR chosen from the CDRs of sequence SEQ ID Nos. 2, 4 and 6 and said heavy chain comprising at least one complementary determining region CDR chosen from the CDRs of sequence SEQ ID Nos. 8, 10, and 12.

The method above mentionned, wherein the antibody decreases IGF-IR activity, concerns mammalian cells selected from the group consisting of, without limitation, breast cancer cells, prostate cancer cells, colorectal cancer cells, lung cancer cells, bladder cancer cells, kidney cancer cells, thyroid cancer cells, osteosarcomas cells, pancreatic cancer cells, melanoma and myeloid cells.

The method above mentionned, wherein the antibody decreases hybrid-R activity, concerns mammalian cells selected from the group consisting of, without limitation, breast cancer cells or thyroid cancer cells. The same for both hybrid-R and IGF-IR.

The invention also concerns a method of identifying an IGF-IR modulator comprising:

a) contacting IGF-IR with an antibody according to the invention able to bind IGF-IR;

b) contacting the complex of (a) with a compound library;

c) identifying a compound which disrupts the complex of (a); and

d) determining whether the compound exhibits agonist or antagonist activity at the IGF-IR, wherein this activity indicates identification of an IGF-IR modulator.

In a second embodiment, the invention consists in a method of identifying a hybrid-R modulator comprising:

a) contacting hybrid-R with an antibody according to the invention able to bind hybrid-R;

b) contacting the complex of (a) with a compound library;

c) identifying a compound which disrupts the complex of (a); and

d) determining whether the compound exhibits agonist or antagonist activity at the hybrid-R, wherein this activity indicates identification of a hybrid-R modulator.

In a third embodiment, a method of identifying an IGF-IR and hybrid-R modulator comprising the following stps is an object of the invention:

a) contacting IGF-IR and hybrid-R with an antibody according to the invention able to bind IGF-IR and hybrid-R;

b) contacting the complex of (a) with a compound library;

c) identifying a compound which disrupts the complex of (a); and

d) determining whether the compound exhibits agonist or antagonist activity at the IGF-IR and hybrid-R, wherein this activity indicates identification of an IGF-IR and hybrid-R modulator.

The present invention is also describing a method of identifying an IGF-IR modulator comprising:

a) screening a library of peptide sequences, wherein said library of peptide sequences bind to IGF-IR, and wherein the library is derived from a peptide sequence comprising at least one sequence selected from the group consisting of SEQ ID Nos. 2, 4, 6, 8, 10 and 12; and

b) determining whether the amino acid sequence isolated in (a) exhibits agonist or antagonist activity at IGF-IR-responsive cell selected from the group consisting of cell lines displaying IGF-IR, such as, for example, MCF-7, T47D, BT20, ZR-75-1, MDA-MB-231 for breast cells, PC3 and DU145 for prostate cells, A549, A427 and SK-LU-1 for lung cells, HT29, Colo205 and CaCo-2 for colon cells, BC-PAP, FRO and ARO for thyroid cells, SK-OV-3 for ovarian cells, BxPC3, MiaPaCa-2 and LN36 for pancreas cells, SK-ES-1 for renal adrenal cancer sarcoma cells, Daoy, TE-671 and D283 Med for medulloblastoma cells, MM-1S and MM-1R for retinoblastoma multiple

myeloma cells and SK-MEL-28 for melanoma cells wherein this activity indicates identification of an IGF-IR modulator.

It is also described a method of identifying a hybrid-R modulator comprising:

a) screening a library of peptide sequences, wherein said library of peptide sequences bind to hybrid-R, and wherein the library is derived from a peptide sequence comprising at least one sequence, preferably 2, 3, 4, 5 and 6 different sequences, selected from the group consisting of SEQ ID Nos. 2, 4, 6, 8, 10 and 12; and

b) determining whether the amino acid sequence isolated in (a) exhibits agonist or antagonist activity at hybrid-R-responsive cell selected from the group consisting of cell lines displaying hybrid-R, such as, for example, MDA-MB-231, MDA-MB-157, MDA-MB-468, MDA-MB-453 and ZR-75 for breast cells and BC-PAP for thyroid cells, wherein this activity indicates identification of an hybrid-R modulator.

Then, in a third embodiment, it is also an objet of the invention to develop a method of identifying an IGF-IR and hybrid-R modulator comprising:

a) screening a library of peptide sequences, wherein said library of peptide sequences bind to IGF-IR and/or hybrid-R, and wherein the library is derived from a peptide sequence comprising at least one sequence, preferably 2, 3, 4, 5 and 6 different sequences, selected from the group consisting of SEQ ID Nos. 2, 4, 6, 8, 10 and 12; and

b) determining whether the amino acid sequence isolated in (a) exhibits agonist or antagonist activity at IGF-IR and/ir hybrid-R-responsive cell selected from the group consisting of cell lines displaying IGF-IR and/or hybrid-R, such as, for example, MCF-7, T47D, BT20, ZR-75-1, MDA-MB-231, MDA-MB-157, MDA-MB-468, MDA-MB-453 and ZR-75 for breast cells, PC3 and DU145 for prostate cells, A549, A427 and SK-LU-1 for lung cells, HT29, Colo205 and CaCo-2 for colon cells, BC-PAP, FRO and ARO for thyroid cells, SK-OV-3 for ovarian cells, BxPC3, MiaPaCa-2 and LN36 for pancreas cells, SK-ES-1 for renal adrenal cancer sarcoma cells, Daoy, TE-671 and D283 Med for medulloblastoma cells, MM-1S and MM-1R for retinoblastoma multiple myeloma cells and SK-MEL-28 for melanoma cells, wherein this activity indicates identification of an IGF-IR and hybrid-R modulator.

An object of the invention isA method of treating or preventing a medical condition in a subject, which medical condition is mediated by elevated expression and/or activation of IGF1, comprising administering a binding composition that specifically binds to IGF-IR comprising at least a member selected from the group consisting of:

a) a light chain amino acid sequence which comprises CDR-L1 defined by SEQ ID No. 2, CDR-L2 defined by SEQ ID No. 4 and CDR-L3 defined by SEQ ID No. 6; and/or

b) a heavy chain amino acid sequence which comprises CDR-H1 defined by SEQ ID No. 8, CDR-H2 defined by SEQ ID No. 10 and CDR-H3 defined by SEQ ID No. 12; to the subject.

In a second embodiment, an object of the inventionis a method of treating or preventing a medical condition in a subject, which medical condition is mediated by elevated expression and/or activation of hybrid-R comprising administering a binding composition that specifically binds to hybrid-R comprising at least a member selected from the group consisting of:

a) a light chain amino acid sequence which comprises CDR-L1 defined by SEQ ID No. 2, CDR-L2 defined by SEQ ID No. 4 and CDR-L3 defined by SEQ ID No. 6; and/or

b) a heavy chain amino acid sequence which comprises CDR-H1 defined by SEQ ID No. 8, CDR-H2 defined by SEQ ID No. 10 and CDR-H3 defined by SEQ ID No. 12; to the subject.

In a third embodiment, an object of the invention is a method of treating or preventing a medical condition in a subject, which medical condition is mediated by elevated expression and/or activation of IGF-IR and hybrid-R comprising administering a binding composition that specifically binds to IGF-IR and hybrid-R comprising at least a member selected from the group consisting of:

a) a light chain amino acid sequence which comprises CDR-L1 defined by SEQ ID No. 2, CDR-L2 defined by SEQ ID No. 4 and CDR-L3 defined by SEQ ID No. 6; and/or

b) a heavy chain amino acid sequence which comprises CDR-H1 defined by SEQ ID No. 8, CDR-H2 defined by SEQ ID No. 10 and CDR-H3 defined by SEQ ID No. 12; to the subject.

Another object of the invention is a method of determining regression, progression or onset of a pathological disorder characterized by increased expression and/or activation of human IGF-IR relative to normal comprising incubating a sample obtained from a patient with said disorder with a detectable probe that is specific for said human IGF-IR under conditions favoring formation of a probe/IGF-IR complex, the presence of which is indicative of the regression, progression or onset of said pathological disorder in said patient.

In a second embodiment, another object of the invention is a method of determining regression, progression or onset of a pathological disorder characterized by increased expression and/or activation of human hybrid-R relative to normal comprising incubating a sample obtained from a patient with said disorder with a detectable probe that is specific for said human hybrid-R under conditions favoring formation of a probe/hybrid-R complex, the presence of which is indicative of the regression, progression or onset of said pathological disorder in said patient.

In a third embodiment, another aspect of the invention is a method of determining regression, progression or onset of a pathological disorder characterized by increased expression and/or activation of both human IGF-IR and hybrid-R relative to normal comprising incubating a sample obtained from a patient with said disorder with a detectable probe that is specific for said human IGF-IR and hybrid-R under conditions favoring formation of a probe/hybrid-R and probe.IGF-IR complex, the presence of which is indicative of the regression, progression or onset of said pathological disorder in said patient.

By references to "normal", it is intended to normal expression or normal activation of IGF-IR, hybrid-R or both. Any methods of determining expression, or activation, levels known by the man skilled in the art can be used and is incorporated in the present specification. An example of such a method is described in example 42 hereinafter.

In the method above described, the probe is preferably an antibody, said antibody being preferably labeled with a radioactive label, a fluorescent label or an enzyme, and said antibody preferably comprising the antibody of the invention as described in the present specification.

Still another aspect of the invention is a method of following progress of a therapeutic regimen designed to alleviate a condition characterized by abnormal expression and/or activation of human IGF-IR relative to normal comprising:

a) assaying a sample from a subject to determine level of expression and/or activation of said IGF-IR at a first time point;

b) administering the antibody of the invention able to binf IGF-IR to said subject and assaying level of expression and/or activation of said IGF-IR at subsequent time points following administration of said antibody; and

c) comparing said level of said IGF-IR at said subsequent time points to the level determined in (a) as a determination of effect of said therapeutic regimen, wherein a decrease in said level of expression and/or activation of IGF-IR subsequent to administration of said anti-IGF-IR antibody indicates a positive progression of the therapeutic regimen designed to alleviate said condition.

In a second embodiment, it is also a aspect of the invention to protect a method of following progress of a therapeutic regimen designed to alleviate a condition characterized by abnormal expression and/or activation of human hybrid-R relative to normal comprising:

a) assaying a sample from a subject to determine level of expression and/or activation of said hybrid-R at a first time point;

b) administering the antibody of the invention able to bind hybrid-R to said subject and assaying level of expression and/or activation of said hybrid-R at subsequent time points following administration of said antibody; and

c) comparing said level of said hybrid-R at said subsequent time points to the level determined in (a) as a determination of effect of said therapeutic regimen, wherein a decrease in said level of expression and/or activation of hybrid-R subsequent to administration of said anti-hybrid-R antibody indicates a positive progression of the therapeutic regimen designed to alleviate said condition.

In a third aspect, the invention is claiming a method of following progress of a therapeutic regimen designed to alleviate a condition characterized by abnormal expression and/or activation of both human IGF-IR and hybrid-R relative to normal comprising:

a) assaying a sample from a subject to determine level of expression and/or activation of said IGF-IR and hybrid-R at a first time point;

b) administering the antibody of the invention able to bind both IGF-IR and hybrid-R to said subject and assaying level of expression and/or activation of said IGF-IR and hybrid-R at subsequent time points following administration of said antibody; and

c) comparing said level of said IGF-IR and hybrid-R at said subsequent time points to the level determined in (a) as a determination of effect of said therapeutic regimen, wherein a decrease in said level of expression and/or activation of IGF-IR and hybrid-R subsequent to administration of said anti-IGF-IR and hybrid-R antibody indicates a positive progression of the therapeutic regimen designed to alleviate said condition.

The condition above mentioned comprises i) a tumor that expresses at least an IGF-IR, preferably breast cancer, prostate cancer, colorectal cancer, lung cancer, bladder cancer, kidney cancer, thyroid cancer, osteosarcomas, pancreatic cancer, melanoma and myeloid cancer; or ii) a tumor that expresses at least a hybrid-R, preferably breast cancer or thyroid cancer.

The methods above described can also include, before the administration of step b), the step consisting in measuring the concentration of a specific tumoral antigen in a body sample from the mammal, wherein an elevated concentration of said specific tumoral antigen above a reference range for said specific tumoral antigen indicates a increased risk for cancer.

Specific timoral antigen are described in example 43 hereinafter. Genetic markers can also be used (see example 43).

Methods above described, preferably methods of treating/preventing a medical condition or methods of following progress of a therapeutic regimen are comprising administering to said mammal the antibody of the invention in combination with an

agent selected from the group consisting of a corticosteroid, anti-emetic, cancer vaccine, analgesic, anti-vascular agent, cytokines, non-specific immunostimulant and anti-proliferative agent.

In a preferred embodiment, said anti-emetic agent is selected from the group consisting of, without limitation, ondansetron hydrochloride, granisetron hydrochloride, metroclopramide, domperidone, haloperidol, cyclizine, lorazepam, prochlorperazine, dexamethasone, levomepromazine, or tropisetron.

In another preferred embodiment, said analgesic agent is selected from the group consisting of, without limitation, ibuprofen, naproxen, choline magnesium trisalicylate, or oxycodone hydrochloride.

In another particularly preferred embodiment, said anti-proliferative agent is selected from the group consisting of, without limitation, farnesyl protein transferase inhibitors, .alpha.v.beta.3 inhibitors, .alpha.v.beta.5 inhibitors, p53 inhibitors, VEGF inhibitors, VEGFR inhibitors, EGFR inhibitors and Her2neu inhibitors or heterodimers thereof, and PDGFR inhibitors.

Methods above described, preferably methods of treating/preventing a medical condition or methods of following progress of a therapeutic regimen are characterized in that said antibody comprises a heavy chain comprising the amino acid sequences of CDR-1, CDR-2, and CDR-3 wherein said heavy chain CDR's are selected from the group consisting of SEQ ID Nos. 8, 10 or 12, and a light chain comprising the amino acid sequences of CDR-1, CDR-2, and CDR-3, wherein said light chain CDR's are selected from the group consisting of SEQ ID Nos. 2, 4 or 6, or sequences having changes from said CDR sequences selected from the group consisting of conservative changes, wherein said conservative changes are selected from the group consisting of replacement of nonpolar residues by other nonpolar residues, replacement of polar charged residues by other polar uncharged residues, replacement of polar charged residues by other polar charged residues, and substitution of structurally similar residues; and non-conservative substitutions, wherein said non-conservative substitutions are selected from the group consisting of substitution of polar charged residue for polar uncharged residues and substitution of non-polar residues for polar residues, additions and deletions.

In another aspect of the invention, it is claimed a pharmaceutical composition for the treatment or prevention of a disorder in a mammal comprising an amount of a human anti-IGF-IR antibody that is effective in treating said disorder and a pharmaceutically acceptable carrier, wherein said disorder is selected from the group consisting of breast cancer, prostate cancer cells, colorectal cancer cells, lung cancer cells, bladder cancer cells, kidney cancer cells, thyroid cancer cells, osteosarcomas cells, pancreatic cancer cells, and myeloid cells, wherein said antibody comprises the antibody of the invention above described and able to bind IGF-IR.

Another embodiment is a pharmaceutical composition for the treatment or prevention of a disorder in a mammal comprising an amount of a human anti-hybrid-R antibody that is effective in treating said disorder and a pharmaceutically acceptable carrier, wherein said disorder is selected from the group consisting of breast cancer and thyroid cancer, wherein said antibody comprises the antibody of the invention able to bind hybrid-R.

Another embodiment is also a pharmaceutical composition for the treatment or prevention of a disorder in a mammal comprising an amount of a human anti-IGF-IR and hybrid-R antibody that is effective in treating said disorder and a pharmaceutically acceptable carrier, wherein said disorder is selected from the group consisting of breast cancer and thyroid cancer, wherein said antibody comprises the antibody of the invention able to bind IGF-IR and hybrid-R.

Said pharmaceutical composition(s) is further comprising an amount of anti-emetic, cancer vaccine, analgesic, anti-vascular agent, and anti-proliferative agent that, in combination with said antibody, is effective in treating said disorder.

The invention concerns, in another aspect, a method of detecting a binding partner for the antibody of the invention able to bind IGF-IR in a sample, the method comprising:

a) incubating the antibody of the invention able to bind IGF-IR with a biological sample obtained from a patient with a cell proliferative disorder characterized by abnormal level of expression and/or activation of human IGF-IR under conditions sufficient to allow specific binding of the antibody to its binding partner, and

b) detecting specific binding, wherein specific binding indicates the presence of a binding partner in the sample.

A second embodiment is a method of detecting a binding partner for the antibody of the invention able to bind hybrid-R in a sample, the method comprising:

a) incubating the antibody of the invention able to bind hybrid-R with a biological sample obtained from a patient with a cell proliferative disorder characterized by abnormal level of expression and/or activation of human hybrid-R under conditions sufficient to allow specific binding of the antibody to its binding partner, and

b) detecting specific binding, wherein specific binding indicates the presence of a binding partner in the sample.

A third embodiment of the invention is a method of detecting binding partners for the antibody of the invention able to bind IGF-IR and hybrid-R in a sample, the method comprising:

a) incubating the antibody of the invention able to bind IGF-IR and hybrid-R with a biological sample obtained from a patient with a cell proliferative disorder characterized by abnormal level of expression and/or activation of both human IGF-IR and hybrid-R under conditions sufficient to allow specific binding of the antibody to its binding partner, and

b) detecting specific binding, wherein specific binding indicates the presence of a binding partner in the sample.

The invention also deals with a method of purifying a hybrid receptor from a sample, the method comprising:

a) incubating the antibody of the invention able to bind hybrid-R with a sample under conditions to allow specific binding of the antibody and the receptor, and

b) separating the antibody from the sample and obtaining the purified receptor.

A second embodiment is a method of purifying a IGF-IR from a sample, the method comprising:

a) incubating the antibody of the invention able to bind IGF-IR with a sample under conditions to allow specific binding of the antibody and the receptor, and

b) separating the antibody from the sample and obtaining the purified receptor.

At least, it is also an object of the invention to protect the use of the biological data obtained according to one of the methods of the invention for the determination and/or modification of a therapeutic treatment or regimen.

Other characteristics and advantages of the invention appear in the continuation of the description with the examples and the figures whose legends are represented below.

LEGENDS TO THE FIGURES

Figure 1: Schematic representation of IGF-IR.

Figure 2: Scheme of the transduction of the signals mediated by IGF-IR during the attachment of IGFs.

Figures 3A, 3B and 3C: Recognition of native IGF-IR expressed on the surface of MCF-7 cells by the monoclonal antibody 7C10.

For this experiment, the MCF-7 cells are incubated with the 7C10 antibody or with a negative control antibody, then recovered with the aid of a fluorescent anti-species secondary antibody. The labeling is read on a FACS. The first histogram (figure 3A) corresponds to the MCF-7 cells alone. In the second histogram (figure 3B), the unshaded curve corresponds to the nonspecific labeling by a control isotype murine antibody. In the third histogram (figure 3C), the unshaded curve shows the recognition of IGF-IR by MAB 7C10.

Figures 4A, 4B and 4C: Labeling of Sf9 insect cells respectively expressing IGF-IR or IR.

Figure 4A shows the labeling of nontransfected cells alone (1) or cells labeled with control commercial monoclonal antibodies respectively recognizing IGF-IR (2) or IR (3). In figure 4B, Sf9 cells uniquely expressing IGF-IR are labeled with αIR3 (2) or anti-IR(3), the peak (1) representing the single cells. In figure 4C, Sf9 cells uniquely expressing IR are labeled with an anti-IR (3) or αIR3 (2), the peak (1) representing the single cells.

Figure 5: Inhibitor effect of 7C10 antibody on the proliferation of MCF-7 cells induced by IGF-I.

The MCF-7 cells are incubated in the presence of increasing concentrations of IGF1 in the presence or in the absence of the MAB to be tested. The cell proliferation is evaluated by following the incorporation of ^{3}H thymidine. The commercial antibody αIR3 is used as a positive control of the experiment. The 7G3 is a murine anti-IGF-IR IgG1 without activity on proliferation and used as a control isotype.

Figures 6A, 6B and 6C:

- figure 6A: *in vivo* effect of the monoclonal antibody 7C10 on the growth of MCF-7 tumors established in nude mice;

- figures 6B and 6C: figures respectively from publications of Arteaga et al. (J. Clin. Invest., 84, 1418-1423, 1989) and from Li et al. (Cancer Immunol. Immunother., 49, 243-252), and showing for figure 6B the effect of murine αIR3 (likewise written aIR3) and for figure 6C the effect of a recombinant scFv-Fc derived from the 1H7 antibody on tumor growth.

Figure 7: Comparative study of the effect of the MAb 7C10 and of tamoxifen on the growth *in vivo* of the tumor MCF-7.

Figures 8A, 8B, 8C and 8D: Study of the antitumor activity of the murine antibody 7C10 in different xenograft models of tumor cells *in vivo*.

Figure 8A shows the results obtained on an osteosarcoma model SK-ES-1, figure 8B concerns an androgen-independent tumor of the prostate DU-145, figure 8C a model of non-small cell tumor of the lung A549 and figure 8D a model of pancreatic cancer BxPC3. In these 4 models, the treatment was carried out twice per week i.p. at a rate of 250 μg/dose/mouse. The curves 7G3, EC2 and 9G4 correspond respectively to three murine IgG1 used as an experiment control isotype in each of the models.

Figure 9: Study of the antitumor effect of the MAb 7C10 compared to navelbine (vinorelbine) as well as the synergy of the two compounds on the growth *in vivo* of the line A549.

Figure 10: Comparative activity of MAb αIR3, 7C10 and 1H7 on the IGF2 proliferation induced by MCF-7 cells.

Figure 11: Comparison of the murine 7C10 and chimeric C7C10 MAb for the inhibition of the IGF1 proliferation of MCF-7 cells *in vitro*. The antibody 9G4 is a murine IgG1 used as an experiment control isotype.

Figure 12: Comparative effect of the 7C10 and h7C10 MAb (humanized 1, written here 7H2HM) on the *in vitro* model of IGF1-induced proliferation of MCF-7 cells.

Figure 13: Effect of the 7C10 and h7C10 MAb (humanized 1, written here 7H2HM) on the transduction of the signal induced by IGF1. The first line of spots corresponds to the revelation, by an antiphospho-tyrosine antibody, of the phosphorylation of the immunoprecipitated β chain from the cells incubated in the presence of IGF1 alone or of IGF1 mixed with various antibodies to be tested. The 9G4 and the hIgG1 are respectively the control isotypes of the forms 7C10 and h7C10 (likewise written 7H2HM). The second line of spots corresponds to the revelation of the β chain and shows that the quantity deposited in all of the wells is perfectly equivalent.

Figure 14: Sequence of the cDNA (SEQ ID No. 48), of its complementary strand (SEQ ID No. 50) and its translation into amino acids (SEQ ID No. 49), of the PCR fragment amplified from the mouse hybridoma 7C10 with the primers MKV-1 and MKC and which codes for the 3' end of the leader peptide and 7C10 VL.

Figure 15: Sequence of the cDNA (SEQ ID No. 51), of its complementary strand (SEQ ID No. 53) and its translation into amino acids (SEQ ID No. 52), of the PCR fragment amplified from the mouse hybridoma 7C10 with the primers MHV-12 and MHC-1, or MHV-8 and MHC-1 and which codes for the 3' end of the leader peptide and 7C10 VH.

Figure 16: Recognition of the IGF-I receptor by the chimeric antibody 7C10, likewise called C7C10 (supernatant of cos7-transfected cell culture).

Figure 17: Comparison of the amino acid sequence of mouse 7C10 VL (SEQ ID No. 54) with cells of other mouse antibodies having the greatest sequence homology.

The numbering of the amino acids is that of Kabat et al. (1991). The residues in the framework regions (outside CDRs) which differ between 7C10 VL and Kabat mouse subgroup II (SEQ ID No. 57) are underlined. A dot indicates that the residue is identical at this position in comparison with the sequence of 7C10 VL. DRB1-4.3 (SEQ ID No. 55) represents the sequence of the light chain of an anti-human mouse antibody MHC CLASS II B-Chain (access number in the Kabat databank is N011794). C94-5B11'CL (SEQ ID No. 56) represents the sequence of the light chain of a mouse antibody (access number in the Kabat databank is P019314).

Figure 18: Comparison of amino acid sequences of mouse 7C10 VL (SEQ ID No. 54) with cells of human light chains belonging to Kabat human subgroup II (SEQ ID No. 60) and having the greatest sequence homology.

The amino acid sequences are aligned and compared with that of mouse 7C10 VL. A dot indicates that the residue is identical at this position in comparison with the sequence of 7C10 VL. GM607 (SEQ ID No. 58) represents the sequence of the kappa light chain secreted by the human lymphoblastoid line GM607 (Klobeck et al., Nucleic Acids Res., 12:6995-7006, 1984a and Klobeck et al., Nature, 309:73-76, 1984b, the access number in the Kabat databank is N011606). DPK15/A19 (SEQ ID No. 59) represents the sequence of the human V germinal line kappa II.

Figure 19: Comparison of amino acid sequences of variable regions of the light chains (VL) of mouse 7C10 (SEQ ID No. 54), of human antibody GM 607 (SEQ ID No. 58) and of two versions of humanized 7C10 1 and 2 (SEQ ID Nos. 61 and 65).

The amino acid sequences are aligned and compared with that of mouse 7C10 VL. A dot indicates that the residue is identical at this position in comparison with the sequence of 7C10 VL. GM607 represents the sequence of the kappa light chain secreted by the human lymphoblastoid line GM607 (Klobeck et al., 1984a and 1984b, access number in the Kabat database: N011606).

Figure 20: cDNA sequence (SEQ ID No. 62), its complementary strand (SEQ ID No. 64) and its translation into amino acids (SEQ ID No. 63), of the gene constructed by *de novo* assembly coding for the leader peptide and the humanized version 1 of 7C10 VL.

Figure 21: cDNA sequence (SEQ ID No. 66), its complementary strand (SEQ ID No. 68) and its translation into amino acids (SEQ ID No. 67), of the gene constructed by *de novo* assembly coding for the leader peptide and the humanized version 2 of 7C10 VL.

Figure 22: Comparison of the amino acid sequences of mouse 7C10 VH (SEQ ID No. 69) with those of human mouse heavy chains belonging to Kabat mouse subgroup I(A) and having the greatest sequence homology.

The numbering of the amino acids is that of Kabat et al. (1991). The residues in the framework regions (outside CDRs) which differ between 7C10 VH and Kabat mouse subgroup I(A) (SEQ ID No. 71) are underlined. A dot indicates that the residue is identical at this position in comparison with the sequence of mouse 7C10 VH.

AN03'CL (SEQ ID No. 70) represents the sequence of the heavy chain of a mouse antibody (access number in the Kabat databank: P001289).

Figure 23: Comparison of amino acid sequences of mouse 7C10 VH (SEQ ID No. 69) with those of human heavy chains belonging to the Kabat human subgroup II (SEQ ID No. 72) and having the greatest sequence homology.

The underlined residues are part of the canonical structures defined by Chothia et al. (1989). A dot indicates that the residue is identical at this position in comparison with the mouse 7C10 VH sequence. Human VH FUR1'CL (SEQ ID No. 73) represents the sequence of the heavy chain of a human anti-lamin B antibody IgM/K of autoimmune origin (Mariette et al., Arthritis and Rheumatism, 36:1315-1324, 1993; access number in Kabat: N020619). Human germline (SEQ ID No. 74) represents the sequence of the human germinal line 4.22 VH IV (Sanz et al., EMBO. J. 8:3741-3748, 1989).

Figure 24: Comparison of the amino acid sequences of the variable regions of the heavy chains (VH) of mouse 7C10 (SEQ ID No. 69) and of the three versions humanized by CDR-grafting humanized VH 1, 2 and 3 (respectively SEQ ID Nos. 75, 79 and 83).

The numbering of the residues corresponds to that of Kabat. The sequences are aligned and compared with that of mouse 7C10 VH. A dot indicates that the residue is identical at this position in comparison with the sequence of mouse 7C10 VH.

Figure 25: cDNA sequence (SEQ ID No. 76), its complementary strand (SEQ ID No. 78) and its translation into amino acids (SEQ ID No. 77), of the gene constructed by *de novo* assembly coding for the leader peptide and the humanized version 1 of 7C10 VH.

Figure 26: cDNA sequence (SEQ ID No. 80), its complementary strand (SEQ ID No. 82) and its translation into amino acids (SEQ ID No. 81), of the gene constructed by *de novo* assembly coding for the leader peptide and the humanized version 2 of 7C10 VH.

Figure 27: cDNA sequence (SEQ ID No. 84), its complementary strand (SEQ ID No. 86) and its translation into amino acids (SEQ ID No. 85), of the gene constructed by *de novo* assembly coding for the leader peptide and the humanized version 3 of 7C10 VH.

Figure 28: Comparison of the recognition activity of the IGF-I receptor by the chimeric antibody 7C10 (called "C7C10") and its humanized version 1 (7C10 hum 1) in ELISA.

Figure 29: Influence on the recognition activity of the IGF-I receptor of the humanized versions 1 and 2 of the light chain of the 7C10 antibody in ELISA.

Figure 30: Comparison of the recognition activity of the IGF-I receptor by the chimeric antibody 7C10 and three humanized versions of the heavy chain (7C10 hum 1, 2 and 3) in combination with humanized 7C10 VL 2 in ELISA.

Figure 31: Antitumor activity of the 7C10 antibody in an orthotopic model A549.

Figures 32A, 32B, 32C and 32D: Study of the ADCC observed at the level of A549 and MCF-7 cells cultured during 4 hours in the presence of the antibody 7H2HM (respectively figures 32C and 32D). The antibody h4D5 is used in parallel as an experiment positive control for the cells A549 and MCF-7 (respectively figures 32A and 32B).

Figures 33A, 33B and 33C: Effects of the antibodies 7C10 and 7H2HM on the cell cycle of the MCF-7 cells.

Figure 33A represents the proportion of MCF-7 cells in the G0/G1, S and G2/M phase in the absence of IGF1, expressed as a significant percentage of total MCF-7 cells observed.

Figure 33B represents the proportion of MCF-7 cells in the G0/G1, S and G2/M phase in the presence of IGF1, expressed as a percentage of total MCF-7 cells observed.

Figure 33C represents the proportion of MCF-7 cells in the S (■) and G2/M (□) phase, expressed as a percentage of total MCF-7 cells observed, in the presence of the compounds indicated in the figure compared with a control sample in the absence of IGF1 ("0").

Figures 34A and 34B: Comparative effect of the antibodies 7C10 and 7H2HM on the growth of A549 cells in vitro (figure 34A) and on the growth of MCF-7 cells in vivo (figure 34B).

Figures 35A and 35B: Study of the synergy of the antibody 7H2HM combined with navelbine (NA) on the model A549 *in vivo*, compared with the control samples. Figure 35A represents the development of the volume of the implanted tumor as a function of the treatment carried out starting from the commencement of the treatment and over approximately 50 days (figure 35A). Figure 35B represents in a particular manner the results obtained for this development compared at approximately 48 days. In this figure, the results obtained with the antibody 7C10 have been introduced by way of comparison (the asterisks (*) correspond to the comparison control group/group (7C10 + Na) or control group/group (7H2HM + Na) in a t-test).

Figure 36: Study of the effect of the antibodies 7C10 and 7H2HM on apoptosis.

This figure represents the potentiation of the effect of doxorubicin by the antibodies 7C10 and 7H2HM (doxorubicin 2 μg/ml).

Figures 37A to 37D: Demonstration by labeling in FACS of the presence of EGFR and of IGF-IR on the surface of A549 cells.

Figure 38: Effect of a coadministration of the MAB 7C10 and 225 on the in vivo growth of the tumor A549.

Figure 39: Effect of a coadministration of the MAB 7C10 and 225 on the survival of mice orthotopically implanted with A549 cells.

Figures 40A and 40B: Demonstration of the inhibition of tyrosine phosphorylation of the beta chain of IGF-IR and of IRS-1 by the MAB 7C10 and 7H2HM.

Figure 41: Demonstration of the induction of the internalization of IGF-IR by the MAB 7C10 and 7H2HM.

Figures 42A to 42C: Demonstration of the degradation of IGF-IR by the MAB 7C10 and 7H2HM.

Figures 43A and 43B: Immuno-blotting with an anti-IGF-IR β-subunit and anti-IR β-subunit on filters containing cellular lysates obtained after immunoprecipitation and SDS-PAGE for two independent experiments (A and B).

Figure 44: Immunocapture of R+ cell lysates IGF-IR in Maxisorb plates coated with 17-69 antibody and binding by ^{125}I-IGF1 in the absence or the presence of increasing concentrations of unlabeled ligand (IGF-I) or antibodies (7C10, h7C10, 1H7, 9G4).

Figure 45: Immunocapture of R-/IR-A cell lysates Hybrid-R^A in Maxisorb plates coated with 83-7 antibody and binding by ^{125}I-IGF1 in the absence or the presence of increasing concentrations of unlabeled ligand (IGF-I) or antibodies (7C10, h7C10, 1H7, 9G4).

Figure 46: Immunocapture of R-/IR-B cell lysates Hybrid-R^B in Maxisorb plates coated with 83-7 antibody and binding by ^{125}I-IGF1 in the absence or the presence of increasing concentrations of unlabeled ligand (IGF-I) or antibodies (7C10, h7C10, 1H7, 9G4).

Figures 47A and 47B: Immuno-blotting analysis of antibody induced degradation of the IGF-IR in A549 (A) and MCF-7 (B) cells.

Figure 48: Immuno-blotting analysis of antibody degradation pathway of IGF-IR in MCF-7 cells.

Figure 49: Anti-tumoral activity of the murine antibody 7C10 co-administrated with an anti-VEGF antibody on mice orthopically implanted with A549 cells.

Figures 50 and 51: Comparison of the in vivo anti-tumoral activity of the 7C10 and h7C10 antibodies on the A549 (figure 50) and MCF-7 (figure 51) models.

Figures 52 and 53: Comparison of the anti-leukaemia activity of vinblastine and vincristine (figure 52) and of 4'R and 4'S deoxyvinblastines(figure 53).

Figure 54: *In vivo* antitumor activity of 4' R- and 4' S-deoxyvinblastines conjugated with IGR-IR antibodies on human tumors of various origins.

Figure 55: Schematic representation of the biosensor capturing assay. A Mab directed against the constant Fc portion of either mouse or human IgG1 were covalently attached onto a CM5 sensor surface. A limited amount (400 RU) of Mab to be tested were immobilized and used to capture the analyte hIGF-IR. The binding of Mab to the analyte is described by the association and dissociation rate constants k_a and k_d, respectively.

Figures 56A, 56B and 56C: Determination of h7C10 IC_{50} in the IGF1 induced proliferative assay. Results are expressed as proliferative indexes in panel A. Panel B shows an example of IC_{50} calculation and panel C summarizes the IC_{50} data obtained with 5 different batches of h7C10 antibody.

Figures 57A, 57B, 57C and 57D: 7C10 causes rapid down-regulation of IGF-IR via the proteasome pathway (fig. 57A). Lysosomal/endosomal pathways (figs. 57B and 57C) seem also to be involved in the antibody-induced down-regulation. Panel (fig. 57D) shows the low recovery of the IGF-IR after antibody treatment. In these figures 9G4 and 7G3 Mabs are respectively a irrelevant IgG1 antibody and an non neutralizing anti-IGF-IR antibody (IgG1 isotype).

Figure 58: staining of either tumoral or normal tissues from lung and breast cancer patients. Comparison with tissues from normal regions.

Figure 59: h7C10 down regulation of IGF-IR *in vivo*. Nine Swiss Nude mice bearing a MCF-7 xenograft tumor were studied. Tumors from 3 mice were removed before treatment (lanes 1-3), 3 mice were treated with h7C10 (lanes 4-6) and 3 mice received a human isotype control (IgG1). Lane 9 is not interpretable because of the low amount of

protein loaded (CK19).

Figures 60A, 60B, 60C: Determination of h7C10 IC_{50} in the IGF2 induced proliferative assay. Results are expressed as proliferative indexes in panel A. Panel B shows an example of IC_{50} calculation and panel C summarizes the IC_{50} data obtained with 5 different batches of h7C10 antibody.

Example 1: Generation and selection of the murine monoclonal antibody (MAb)

With the aim of generating MAb specifically directed against IGF-IR and not recognizing the IR, a protocol comprising 6 screening stages was envisaged.

It consisted in:

- immunizing mice with recombinant IGF-IR, in order to generate hybridomas,
- screening the culture supernatants by ELISA on the recombinant protein which served for immunization,
- testing all the supernatants of hybridomas positive by ELISA on the native receptor overexpressed on the surface of MCF-7 tumor cells,
- evaluating the supernatants of hybridomas positive in the two first screenings in terms of differential recognition of IGF-IR and of IR on insect cells infected with baculoviruses respectively expressing IGF-IR or IR,
- verifying that the antibodies selected at this stage were capable of inhibiting *in vitro* the induced IGF1 proliferation of the MCF-7 cells,
- ensuring the *in vivo* activity, in nude mice, of the candidate retained in terms of impact on the growth of the tumor MCF-7.

All of these different stages and results obtained will be briefly described below in example 1.

For the immunization stage, mice were injected twice, by the subcutaneous route, with 8 μg of recombinant IGF-IR. Three days before the fusion of the cells of the female rat with the cells of the murine myeloma Sp2OAg14, the mice were stimulated by an intravenous injection of 3 μg of the recombinant receptor. Fourteen days after the fusion, the supernatants of hybridomas were screened by ELISA, on plates sensitized by recombinant IGF-IR. The hybridomas whose supernatants were found positive were conserved and amplified before being tested on the FACScan so as to verify that the antibodies produced were likewise capable of recognizing native IGF-IR. In order to do

this, MCF-7 cells from an estrogen-dependent tumor of the breast overexpressing IGF-IR were incubated with each of the culture supernatants produced by the hybridomas selected in ELISA. The native/MAb receptor complexes on the surface of the cell were revealed by a secondary anti-species antibody coupled to a fluorochrome. Figures 3A to 3C show a histogram type obtained with the supernatant of the hybridoma 7C10 (figure 3C) compared with a cell labeling alone + secondary antibody (figure 3A) or with a labeling utilizing a control isotype (figure 3B).

At this stage of the selection, only the hybridomas secreting MAb at the same time recognizing the recombinant receptor and the native receptor were selected and cloned. The MAb secreted by these hybridomas were produced and then purified before being tested on the FACScan, according to the method described above, on Sf9 insect cells expressing IGF-IR or IR in order to eliminate the hybridomas at the same time recognizing the two receptors. Figure 4A shows a total recovery of the histograms 1, 2, 3 respectively corresponding to the noninfected cells + secondary antibodies (1), to the noninfected cells labeled by αIR3 + secondary antibodies (2) and to the noninfected cells labeled by an anti-IR antibody + secondary antibodies (3). This first result shows well the absence of IGF-IR and of IR detectable on the surface of these noninfected insect cells. Figure 4B shows a labeling of infected cells by a baculovirus expressing IGF-IR. In this second figure, the αIR3, used as a positive control, labels well, as expected, the cells (peak 2), while the anti-IR (peak 3) is superimposed on the peak of single cells. Finally, in figure 4C, it is shown that the anti-IR labels well, as expected, the Sf9 cells expressing the IR (peak 3), but in an unexpected manner, the αIR3 described in the literature as specific for IGF-IR seems likewise to recognize the IR (peak 2).

The results obtained in this third screening system are summarized in table 1 and show the generation of an MAb: 7C10, satisfying the criteria of recognition of the IGF-IR and of nonrecognition of the IR. The isotyping of the Mab 7C10 has shown that it involves an IgG1.

TABLE 1: Comparative reactivity of MAb 7C10 on Sf9 insect cells expressing IGF-IR or IR

	MFI (Mean fluorescence intensity)		
	Noninfected cells	IGF1R + cells	IR + cells
Cells	8	8	7
Anti-IR	4.6	9	91
Anti-IGF-IR (αIR3)	9	35	32
EC2	8	13	11
Anti-mouse FITC	4.3	9	13
UltraCulture medium	9	10	11
15B9	7.5	25	77.8
9F5D	8	41	40
13G5	7.8	37	24
7C10	8.6	49	13

The two last screenings provided for the selection of the MAb consisted in verifying that the latter was very capable of inhibiting the cell proliferation induced by the IGF1 *in vitro* and *in vivo* on the cell line MCF-7.

For the *in vitro* selection, the MCF-7 cells were inoculated, deprived of fetal calf serum, then incubated in the presence of increasing concentrations of IGF1 (from 1 to 50 ng/ml) in the presence or in the absence of the 7C10 antibody to be tested added to a final concentration of 10 μg/ml. In this experiment, the commercial αIR3 MAb was introduced as a positive control and the 7G3 MAb (isolated in parallel to the 7C10 and weakly recognizing the native receptor (MFI on the FACS of 50 compared with 200 for the MAb 7C10)) as a control isotype. The cell proliferation is estimated by following on the β counter the incorporation of tritiated thymidine by the cells. The results are expressed as a proliferative index. The data presented in figure 5 show that IGF1 is capable of stimulating in a dose-dependent manner the proliferation of the MCF-7 cells. The MAb αIR3, used as a positive control, completely inhibits the proliferation of the MCF-7 cells induced by the IGF-I. In the same manner, the MAb 7C10 significantly inhibits the growth of the MCF-7 cells induced by IGF-I. Finally, the MAb 7G3 used as an isotype control turns out well, as expected, without effect on the tumor cell growth *in vitro* of the MCF-7 cell.

The *in vivo* selection was carried out in an established tumor model. In order to do this, nude mice received a subcutaneous implant of slow-release estrogen, indispensable for the taking of the tumor in a murine model. Twenty-four hours after implantation of the estrogens, 5.10^6 MCF-7 cells are grafted onto the right flank of the mouse subcutaneously. Five days after this cell graft, the tumors are measurable and batches of 6 mice are formed at random. The treatment of the mice is carried out twice per week, during 5 to 6 weeks, at the dose of 250 µg/dose/mouse. In the control group, the mice are treated in the same fashion with a murine control isotype. The results presented in figure 6A show a very significant inhibition of the tumor growth induced by the antibody 7C10. This activity is particularly unexpected if reference is made to the data available concerning αIR3, always used as a reference in the domain of the receptor for IGF1, and known for not having any activity *in vivo* on the growth of estrogen-dependent tumors (see figure 6B). In the same way, compared with the results obtained with the recombinant antibody scFv-Fc derived from the murine MAb 1H7 (see figure 6C), the MAb 7C10 is much more efficacious in the *in vivo* inhibition of the growth of the MCF-7 cells. This difference of activity could be relaty, whithout any limitation, to some particular properties of 7C10 and h7C10 antibodies which recognize the hybrid-R, isoform(s) A and/or B, (see example 26). Another non exclusive hypothesis could be the recognition by these antibodies of the atypical IGF-IR as described in the paper of Siddle et al. (Siddle et al., 1994, Horn Res. 41(suppl. 2):56-65).

Equilibrium dissociation constants (K_D) of a series of 7C10 and h7C10 antibodies directed against the extracellular domain of human insulin-like growth factor-1 receptor (hIGF-IR) were calculated by the ratio between dissociation and association rate constants, as defined by surface plasmon resonance using a BIAcore X instrument. Capture of the investigated antibodies was used to favour a proper presentation of their antigen-binding site (Figure 55). Therefore, a mixture of goat anti-human IgG Fc and rabbit anti-mouse IgG Fc polyclonal antibodies were covalently linked on both flowcells (FC1 and FC2) of a CM5 sensorchip. Typically 300 to 400 resonance units (RU) of each anti-hIGF1-R Mab were captured on FC2 (FC1 being a reference cell to evaluate non specific interactions of the analyte with the matrix). The

analyte, corresponding to the extracellular domain of hIGF1-R, was tested at 5 different concentrations ranging from 12.5 to 200 nM at 25°C at a flow rate of 30 µl/min. Under this experimental set-up, a mean K_D of 0.86 ± 0.09 nM was obtained for 3 different batches of A2CHM Mab. These values were closed to that obtained for the mouse Mab 7C10 (K_D: 0.86 ± 0.14 nM) Table 2.

TABLE 2 : Kinetic rate constants and equilibrium dissociation constant for the interaction of hIGF-IR with a series of immobilized monoclonal antibodies

Antibodies	$k_a \times 10^{-5}$ $M^{-1}s^{-1}$	$k_d \times 10^{-4}$ s^{-1}	$K_D \times 10^{9}$ M	χ^2
7C10	1.66±0.01	1.49±0.03	0.897±0.022	
batch 7	1.82±0.01	1.39±0.03	0.765±0.023	0.631
	1.66±0.01	1.52±0.03	0.920±0.022	1.00
				0.764
Mean	**1.71±0.16 ***	**1.47±0.11 ***	**0.86±0.14 ****	
h7C10	1.11±0.01	0.984±0.030	0.886±0.036	
Batch F50035	1.13±0.01	0.953±0.029	0.844±0.034	0.409
BR2.113B	1.12±0.01	0.974±0.029	0.872±0.034	0.407
				0.396
Mean	**1.12±0.02 ***	**0.97±0.03 ***	**0.87±0.04 ****	
h7C10	1.04±0.01	0.767±0.030	0.736±0.039	
Batch F50035	1.00±0.01	0.827±0.030	0.827±0.038	0.344
BR2.121A	1.01±0.01	0.837±0.030	0.826±0.038	0.381
				0.395
Mean	**1.02±0.04 ***	**0.81±0.06 ***	**0.80±0.09 ****	
h7C10	1.12±0.01	0.967±0.030	0.863±0.034	
Batch F50035	1.14±0.01	1.04±0.03	0.913±0.035	0.403
BR2.113A	1.12±0.01	1.04±0.03	0.927±0.035	0.464
				0.470
Mean	**1.13±0.02 ***	**1.02±0.07 ***	**0.90±0.08 ****	

Rate constants k_a and k_d were determined for each data set by using the global fitting algorithm described in the BIA evaluation 3.1 software and based on a 1:1 Langmuir binding model without incorporating a mass transport term. Quality of the global fitting to the experimental data is indicated by the χ^2 value.

* The 95% confidence intervals of the kinetic rates were calculated using the formula $SE = \sigma/3^{1/2} \times 2.920$.

** The confidence intervals of the K_D were calculated using the formula $SE(K_D) = [SE(k_a) \times k_d + k_a \times SE(k_d)] / k_a^2$.

Example 2: Comparison of the effect of 7C10 and of tamoxifen on the *in vivo* growth of the tumor MCF-7

With the aim of determining the effectiveness of the treatment by the antibody 7C10 in the context of estrogen-dependent cancer of the breast, 7C10 was compared with the tamoxifen compound currently used for the treatment of mammary carcinoma in the context of developed forms with local and/or metastatic progression and in the context of the prevention of recurrences (see VIDAL 2000, pages 1975-1976).

In hormone-dependent cancers of the breast, a significant correlation exists between the expression of the receptors for estrogens (ER) and that of the IGF-IR (Surmacz E. et al., Breast Cancer Res. Treat., Feb., 47(3):255-267, 1998). Furthermore, it seems that the estrogens (E2) act in synergy with IGF1 (sometimes written IGF-I or IGFI) in order to stimulate cell proliferation. It has in effect been shown that a treatment with E2 increases by approximately 10 times the mRNA level of IGF-IR as well as the expression level of the protein (Lee A.V. et al., Mol. Endocrinol., May, 13(5):787-796, 1999). This increase is manifested by a significant increase in the phosphorylation of the IGF-IR. In addition, the E2 significantly stimulates the expression of IRS-1 ("IRS-1" for "Insulin Receptor Substrate-1") which is one of the substrates of the phosphorylated IGF-IR.

Tamoxifen has been widely used for many years in hormone therapy for the treatment of patients suffering from E2-dependent breast cancers (Forbes J.F., Semin. Oncol., Feb., 24 (1st Suppl. 1):S1-5-S1-19, 1997). This molecule enters into competition with the estradiol and inhibits the attachment of this to its receptor (Jordan V.C., Breast Cancer Res. Treat., 31(1):41-52, 1994). It has in addition been demonstrated that tamoxifen is capable of inhibiting the IGF-IR-dependent proliferation by inhibiting the expression of the receptor and its phosphorylation (Guvakova M.A. et al., Cancer Res., July 1, 57(13):2606-2610, 1997). These data as a whole seem to indicate that IGF-IR is an important mediator of the proliferation induced by the E2/ER interaction.

The long-term use of tamoxifen is associated with a significant increase in the risk of endometrial cancer (Fisher et al., J. of National Cancer Institute, 86, 7:527-537, 1994; VIDAL 2000, 1975-1976) and of collateral recurrence of E2-independent cancer of the breast (Li C.I. et al., J. Natl. Cancer Inst., July 4, 93(13):1008-1013, 2001). In this

context, a comparison of the *in vivo* antitumor effect of the antibody 7C10 and of tamoxifen has been carried out on the MCF-7 model so as to determine the part of the activity connected with IGF-IR in the mediated ER proliferation. In order to do this, 7.10^6 MCF-7 cells were implanted sc (subcutaneously) in nude mice, 24 hours after implantation in these same mice of a grain of estradiol with prolonged release (0.72 mg/tablet liberated over 60 days), indispensable for the establishment of any E2-dependent human tumor in this animal species. Five days after this implantation, the tumors are measured and groups of 6 mice are formed. These groups are treated respectively with 1) the 7C10 antibody injected ip (intraperitoneally) at a rate of 250 µg/mouse, twice per week, 2) 10 µg of tamoxifen taken in PBS containing 3% of hydroxypropyl-cellulose (HPC) ip or 3) the solvent in which the tamoxifen is taken up (hydroxypropylcellulose). The tamoxifen is administered daily for 4 weeks except at the weekend. The mice treated with the MAb 7C10 likewise daily receive an injection of PBS with 3% HPC. A study was previously carried out in order to verify that the solvent alone is without influence on the tumor growth.

The results presented in figure 7 shown that the MAb 7C10 is capable of significantly inhibiting the growth of the tumor MCF-7 *in vivo* (the asterisks (*) correspond to the comparison control group/7C10 group in a t-test). In a surprising fashion, the antibody 7C10 seems to be significantly more efficacious than tamoxifen for the inhibition of the tumor growth (the circles (°) correspond to the comparison tamoxifen group/7C10 group in a t-test) suggesting that this type of treatment by MAB might be substituted for treatment with tamoxifen.

Example 3: Demonstration of the antitumor activity of the MAb 7C10 *in vivo* on human tumors of different origins

a) *In vivo* activity of the antibody 7C10 in 4 tumor models

In order to generalize the activity of the 7C10 antibody to other tumors expressing the receptor for IGF1, 7C10 was tested *in vivo* in an androgen-independent model of tumor of the prostate DU145 (likewise written DU-145), in an SKES-1 osteosarcoma model, in a model of non-small cell tumor of the lung A549 and in a model of pancreatic cancer BxPC3. The protocol is comparable to that described above for MCF-7 and the results presented in figures 8A to 8D show a significant activity of

this MAB in the 4 tumor models. The activity observed in the model of tumor of the prostate is to be noted very particularly inasmuch as the single chain scFv of the MAB 1H7 is without activity in an androgen-independent model of tumor of the prostate (Li et al., 2000).

b) *In vivo* activity of the antibody 7C10 in an orthotopic model A549

The conventional xenograft models as described above do not allow the study of drugs on metastatic dissemination. In effect, the tumors implanted s.c. (subcutaneously) remain localized at the sight of injection and are therefore not really a reflection of the situation in man. In order to evaluate our antibody in a model closer to reality, the A549 cells were implanted in an intrapleural location. This model, which is well described (Clin. Cancer Res., 2000, Jan. 6(1):297-304) allows a metastatic dissemination close to that observed in man to be observed, with mediastinal, pulmonary, cardiac and vertebral metas-tases. In the study which was carried out, 10^6 A549 cells were injected intrapleurally into female nude mice. 7 days after implantation, the mice were divided into 2 batches of 22. One of these batches received a challenge dose of 500 µg/mouse and was then treated twice per week at a rate of 250 µg of 7C10/dose. The second batch was treated according to the same scheme with the control isotype 9G4. Figure 31 shows a significant extension of survival in the mice treated with the MAB 7C10 indicating that this antibody is capable of having an action on metastatic dissemination.

Example 4: Comparison of the MAb 7C10 with navelbine *in vivo*; effect of a coadministration of the two treatments

Navelbine is a chemotherapy compound indicated in non-small cell cancer of the lung and in metastatic cancer of the breast. The comparative study of 7C10 and of navelbine and the possible synergy between the two products was studied on the tumor model A549. For this study, 5.10^6 A549 cells were grafted subcutaneously on the right flank of the mouse. Five days after the cell graft, the tumors are measurable and the treatments with MAb and/or navelbine are commenced. The MAb dose is always 250 µg/dose/mouse, twice per week, intra-peritoneally. Concerning navelbine, it will be administered at the maximum dose tolerated by the mouse or 10 mg/kg, intraperitoneally. For this treatment three injections will be carried out at intervals of 7 days. During the coadministrations, the two products are mixed before injection.

The results presented in figure 9 show in a surprising fashion that, in this model, the antibody 7C10 is as active as the conventional treatment with navelbine. A very significant synergy of the two products is likewise observed with five mice out of seven not having measurable tumors on day 72.

Example 5: Study of the *in vitro* inhibition of the IGF2-induced growth of the MCF-7 tumors

As indicated above, IGF-IR is overexpressed by numerous tumors but it has furthermore been described that in a good part of the cancers of the breast and of the colon especially, the proliferation signal is given to this receptor via IGF2 (sometimes written IGF-II or IGFII). It is therefore essential to ensure that the MAb 7C10 is likewise capable of inhibiting the IGF2 growth induced on the MCF-7 tumor *in vitro*. In order to do this, cells were inoculated into 96-well plates, deprived of fetal calf serum and stimulated by the addition of 200 ng of IGF2 per ml, final concentration, of medium, in the presence and in the absence of the MAb to be tested introduced at a concentration of 10 µg/ml. The results presented in figure 10 show that IGF2, like IGF1, significantly stimulates the growth of MCF-7 cells. The addition of a control isotype, 9G4, remains without effect on this stimulation. As already described by De Léon et al. (Growth Factors, 6:327-334, 1992), no effect is observed during the addition of the MAb αIR3. On the other hand, 7C10 totally inhibits the growth induced by IGF2. Its activity is significantly better than that of 1H7.

Example 6: Biological activity of the chimeric 7C10 (C7C10) and humanized (h7C10) antibodies 7C10

a) 7C10/C7C10 and 7C10/h7C10 comparison on the MCF-7 model *in vitro*

The chimeric form of the MAb 7C10 and the purified humanized form 1 (written here 7H2HM) were tested *in vitro* in the MCF-7 model as described above. The results presented respectively in figures 11 and 12 show that these two forms have perfectly preserved their properties of inhibiting the IGF1-induced growth of the MCF-7 tumor.

To determine the IC_{50} values of the h7C10 antibody a dose range of antibodies from various batches has been tested *in vitro* in the IGF1 induced proliferative assay.

The results described in Figure 56 demonstrate that all the tested batches are comparable and display and IC_{50} value close to 0.3 nM. These data are in agreement with the K_D values determined by Biacore analysis and described at the end of example 1.

To determine the IC_{50} values of the h7C10 antibody a dose range of antibodies from various batches has been tested *in vitro* in the IGF2 induced proliferative assay. The results described in Figure 60 demonstrate that all the tested batches are comparable and display and IC_{50} value close to 0.3 nM. These IC_{50} values are close to the one obtained in the IGF1 induced proliferative assay described above.

b) Comparative effect of the MAb 7C10 and h7C10 on the transduction of the signal induced by the attachment of IGF1 to its receptor

The activity of the inhibition of the IGF1 growth induced *in vitro* on the line MCF-7 ought to be the translation of an inhibition of the transduction of the signal mediated by IGF1 during the attachment of the MAb 7C10 to the receptor. In order to verify this hypothesis, MCF-7 cells were incubated with or without IGF1, in the presence or in the absence of the antibodies to be tested. After a short incubation time, the cells were lyzed, the β chain immunoprecipitated and the phosphorylation of this subunit estimated with the aid of an antiphosphotyrosine kinase antibody. The results presented in figure 13 show that the attachment of the 7C10 or of the h7C10 significantly inhibits the phosphorylation of the β subunit of IGF-IR contrary to an irrelevant murine (9G4) or human antibody (written IgG1 on the scheme).

c) Involvement of the 7H2HM antibody in the mechanisms of ADCC

The inhibition of the transduction of the signal described above in paragraph b) is the principal mechanism of action involved in the biological activity of the antibodies 7C10 and 7H2HM. It is, however, probable that during its administration in man, the antibody 7H2HM, of isotype IgG1, is capable of inducing cell lysis by a mechanism of ADCC type (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity). In order to verify this point, NK (Natural Killer) cells coming from the peripheral blood of human donors are placed in the presence of A549 or MCF-7 cells previously incubated for 4 hours with 10 μg f 7H2HM antibody per 5.10^5 cells and labeled with ^{51}Cr (50 μg). In this experiment, herceptin (written h4D5 on figures 32A and 32B) is used as an experiment positive control. Figures 32A to 32D show that, as expected, herceptin induces a significant

ADCC on the two cells A549 and MCF-7 (see respectively figures 32A and 32B). 7H2HM is likewise capable of inducing an ADCC on the A549 cells (see figure 32C), but this phenomenon is of smaller amplitude on the MCF-7 cells (see figure 32D).

Regarding the present example, it would be evident for a man skilled in the art to test, in the same way, other effector functions such as, for example, CDC.

d) Effects of the antibodies 7C10 and 7H2HM on the cell cycle

The inhibition of the cell growth observed in vitro on the line MCF-7 should be manifested by an effect on the cell cycle. In order to reply to this question, 4.10^5 cells are inoculated into 6-well plates. 24 hours after inoculation, the calf serum is removed and IGF1 added in the presence or in the absence of the antibodies to be tested. After incubation for 24 hours, the cells are recovered for the study of the cell cycle. Figure 33B demonstrates the effect of IGF1 on the entry into the cycle and the growth of the MCF-7 cells compared with the entry into the cycle and the growth of the MCF-7 cells in the absence of IGF1 (see figure 33A). After addition of the growth factor, a significant decrease in the G0/G1 phase (from 88.2% to 56.3%) to the benefit of the S (from 7.8% to 31%) and G2/M (from 4% to 12.7%) phases is observed. During the addition of the antibodies 7C10 and 7H2HM (see figure 33C), a significant inhibition of the entry into the cycle is observed. In it is to be noted that the murine antibody and its humanized homolog have a comparable activity on the cell cycle. The αIR3, introduced as a positive control, seems slightly less active than the 7C10 and the 7H2HM in this test. The antibody 9G4 used as a control isotype is without effect on the cell cycle.

e) Comparative activity in vivo of the antibodies 7C10 and 7H2HM on the model A549

In order to confirm the activity of the humanized antibody 7H2HM *in vivo*, the latter was compared with 7C10 in the model of non-small cell tumor of the lung A549. This experiment was carried out exactly as described above except for the dose of antibody which is 125 µg/dose twice per week in place of 250 µg/dose twice per week and that of the fact of the nonavailability of great quantities of 7H2HM. The antibody 9G4 was used as an isotype control for 7C10 and an irrelevant human immunoglobulin of isotype IgG1 (below called HIgG1) was used as a control for the humanized antibody 7H2HM.

Figure 34A shows that there are no significant differences between the 9G4 and HIgG1 control curves. As expected, a significant inhibition of the tumor growth is observed with the murine antibody 7C10. Concerning the humanized antibody 7H2HM, the activity observed is of exactly the same intensity as that observed with its murine counterpart. This data, in addition to the observations described above *in vitro*, indicates that the humanization has not modified the properties of the antibody generated. On the other hand, in the xenograft models in the mouse, the activity of the humanized antibody seems to be integrally connected with a mechanism of inhibition of the transduction of the signal. In effect, if an ADCC part was in play in the inhibition of the tumor growth in the Nude mouse, a difference ought to be observed between the activity of the murine and humanized antibodies.

An *in vivo* experiment was likewise carried out on the MCF-7 breast tumor model and shows that, as expected, the antibody 7H2HM is perfectly comparable with the murine antibody 7C10 for the inhibition of the growth of this tumor *in vivo* (figure 34B).

f) Demonstration of a synergy between the 7H2HM and navelbine

The protocol described in example 4 was repeated with the aim of reproducing the results obtained with 7C10 with its humanized homolog: the antibody 7H2HM.

The results presented in figures 35A and 35B show that, as in the case of 7C10, a significant synergy is demonstrated between the humanized antibody 7H2HM and navelbine.

g) Effect of the antibodies 7C10 and 7H2HM on the apoptosis of MCF-7 cells *in vitro*

As indicated above, IGF-IR is capable of conferring protection against apoptosis when it is overexpressed on the surface of cells. Furthermore, it has been demonstrated in these examples that the antibodies 7C10 and 7H2HM were capable of potentiating an active compound in chemotherapy. In order to test the power of the antibodies 7C10 and 7H2HM to induce apoptosis, and to explain in part their synergy potential with the chemotherapy, experiments were conducted on the MCF-7 cells in the presence or in the absence of doxorubicin, a medicament known to induce the apoptosis of this cell line *in vitro*. In these experiments, the MCF-7 cells are inoculated at $2.10^4/cm^2$ in Petri dishes and cultured for 24 h in RPMI without phenol red supplemented with 10% of

fetal calf serum (FCS). The cells are then washed twice with PBS and put back into culture in medium with 0% FCS. They are allowed an adaptation time of 10 minutes at 37°C before the addition of the antibodies at 10 μg/ml. After an extra 10 minutes at 37°C, recombinant IGF1 (Sigma) is added to the culture medium to a final concentration of 50 ng/ml. The cells are left at 37°C again for one hour in order to allow the attachment of the antibodies and of the IGF-I. Finally, the doxorubicin (Sigma) is added to the culture medium at 2 μg/ml and the cells are incubated for 24 hours at 37°C.

The experiments have likewise been conducted with navelbine at a concentration of 10 μg/ml.

The analysis of the cell viability is carried out by flow cytometric analysis after labeling with the annexin V-FITC (20 minutes, 4°C) and DAPI (2 μg/ml). The percentage of dead cells considered is the labeled population Annexin + / DAPI +. The antibody 5C2 is used as a control isotype.

The results represented in figure 36 show that doxorubicin induces apoptosis in 8% of the MCF-7 cells. When the cells are treated conjointly with the antibody 7C10 and the doxorubicin a significant increase in cell death is observed. The same effect is shown with the antibody 7H2HM. The same type of results was observed when the antibody is combined with navelbine.

Example 7: Cloning strategy of genes coding for the variable regions of the heavy and light chains of the monoclonal antibody (MAb) 7C10

The total RNA was extracted from 10^7 cells of hybridomas secreting the antibody 7C10 by using the TRI REAGENT™ (according to the instructions given by the supplier, SIGMA, T9424). The first cDNA strand was synthesized with the aid of the 'First strand cDNA synthesis' kit of Amersham-Pharmacia (#27-9621-01, according to the instructions given by the supplier). For the two chains, the reaction was primed with the oligonucleotide Not I-d(T)18, comprised in the Kit.

The cDNA:mRNA hybrid thus obtained was used for the amplification by PCR of the genes coding for the heavy and light chains of the Mab 7C10. The PCR were carried out by using a combination of oligonucleotides specific for the heavy and light (Kappa) chains of mouse immunoglobulins. The primers corresponding to the 5' ends hybridize in the region corresponding to the signal peptides (Table 3 for heavy chains,

Table 4 for light chains). These primers were compiled from a large number of mouse antibody sequences found in the databanks (Jones S.T. et al., Bio/Technology 9:88-89, 1991). The primers corresponding to the 3' ends hybridize in the constant regions of the heavy chains (CH1 domain of the subclass IgG1, not far from the V-C junction, MHC-1 primer Table 5) and light chains (Kappa domain not far from the V-C junction, MKC primer Table 5).

TABLE 3: Oligonucleotide primers for the 5' region of the variable domains of the heavy chains of mouse immunoglobulin (MHV) ("MHV" for "Mouse Heavy Variable")

MHV-1:	5' ATGAAATGCAGCTGGGTCATSTTCTT 3'	(SEQ ID No. 13)
MHV-2:	5' ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT 3'	(SEQ ID No. 14)
MHV-3:	5' ATGAAGWTGTGGTTAAACTGGGTTTT 3'	(SEQ ID No. 15)
MHV-4:	5' ATGRACTTTGGGYTCAGCTTGRT 3'	(SEQ ID No. 16)
MHV-5:	5' ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTT 3'	(SEQ ID No. 17)
MHV-6:	5' ATGGCTGTCYTRGSGCTRCTCTTCTG 3'	(SEQ ID No. 18)
MHV-7:	5' ATGGRATGGAGCKGGRTCTTTMTCTT 3'	(SEQ ID No. 19)
MHV-8:	5' ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG 3'	(SEQ ID No. 20)
MHV-9:	5' ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCTATT 3'	(SEQ ID No. 21)
MHV-10:	5' ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCCT 3'	(SEQ ID No. 22)
MHV-11:	5' ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG 3'	(SEQ ID No. 23)
MHV-12:	5' ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCT 3'	(SEQ ID No. 24)

NB KEY: R=A/G,Y=T/C,W=A/T,K=T/G,M=A/C,S=C/G.

TABLE 4: Oligonucleotide primers for the 5' region of the variable domains of kappa (light) chains of mouse immunoglobulin (MKV) ("MKV" for "Mouse Kappa Variable")

MKV-1:	5' ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT 3'	(SEQ ID No. 25)
MKV-2:	5' ATGGAGWCAGACACACTCCTGYTATGGGT 3'	(SEQ ID No. 26)
MKV-3:	5' ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCT 3'	(SEQ ID No. 27)

MKV-4: 5' ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGG 3' (SEQ ID No. 28)

MKV-5: 5' ATGGATTTWCAGGTGCAGATTWTCAGCTT 3' (SEQ ID No. 29)

MKV-5A: 5' ATGGATTTWCARGTGCAGATTWTCAGCTT 3' (SEQ ID No. 30)

MKV-6: 5' ATGAGGTKCYYTGYTSAGYTYCTGRG 3' (SEQ ID No. 31)

MKV-7: 5' ATGGGCWTCAAGATGGAGTCACA 3' (SEQ ID No. 32)

MKV-8: 5' ATGTGGGGAYCTKTTTYCMMTTTTTCAAT 3' (SEQ ID No. 33)

MKV-9: 5' ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTT 3' (SEQ ID No. 34)

MKV-10: 5' ATGTATATATGTTTGTTGTCTATTTC 3' (SEQ ID No. 35)

MKV-11: 5' ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTT 3' (SEQ ID No. 36)

MKV-12A: 5' ATGRAGTYWCAGACCCAGGTCTTYRT 3' (SEQ ID No. 37)

MKV-12B: 5' ATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGT 3' (SEQ ID No. 38)

MKV-13: 5' ATGGATTCACAGGCCCAGGTTCTTAT 3' (SEQ ID No. 39)

NB KEY: R=A/G,Y=T/C,W=A/T,K=T/G,M=A/C,S=C/G.

TABLE 5: Oligonucleotide primers for the 3' ends of the mouse V_H and V_L genes

Light chain (MKC):

5' ACTGGATGGTGGGAAGATGG 3' (SEQ ID No. 40)

Constant region of the mouse Kappa domain:

A D A A P T V S I F P P S S (SEQ ID No. 41)

GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC ATC TTC CCA CCA TCC AGT (SEQ ID No. 42)

(MKC) CC ATC TTC CCA CCA TCC AGT (SEQ ID No. 43)

Heavy chain (MHC-1)

5' CCAGTGGATAGACAGATG 3' (SEQ ID No. 44)

CH1 domain of mouse gamma-1 (IgG1 subclass):

A K T T P P S V Y P L (SEQ ID No. 46)

GCC AAA ACG ACA CCC CCA TCT GTC TAT CCA CTG (SEQ ID No. 45)

(MHC-1) CCC CCA TCT GTC TAT CCA CTG (SEQ ID No. 47)

Example 8: Sequences of immunoglobulins cloned from the mouse hybridoma 7C10

By following the amplification strategy described above, PCR products corresponding to the variable regions of the heavy (VH) and light (VL) chains were cloned by using the "pGEM®-T Easy Vector Systems" (Promega). For 7C10 VL, PCR products were obtained with the MKC primer in combination with the MKV1 and MKV2 primers. For 7C10 VH, PCR products were obtained with the MHC-1 primer in combination with the MHV8 and MHV12 primers. A thorough sequencing of the PCR products cloned in the pGem-T easy vectors revealed two different sequences for the light chain and one unique sequence for the heavy chain.

a) Variable region isolated from the oligo MKV1

The DNA sequence obtained is characteristic of a variable region of functional Ig. This novel sequence is therefore presumed to be that coding for 7C10 VL. The DNA (SEQ ID Nos. 48 and 50) and amino acid (SEQ ID No. 49) sequences of the cDNA coding for 7C10 VL are represented in figure 14.

b) Variable region isolated from the oligo MKV2

The gene coding for this light chain comes from an aberrant mRNA transcript which is present in all the standard fusion partners derived from the original MOPC-21 tumor of which the mouse myeloma Sp2/Oag14, which was used in order to produce the 7C10 hybridoma, is part. This sequence contains an aberrant recombination between the V and J genes (deletion of four nucleotide bases involving a change in the reading frame) and a mutation of the invariable cysteine in position 23 to tyrosine. These changes suggest that this light chain would be nonfunctional although nevertheless transcribed to messenger RNA. The DNA sequence of this pseudo light chain is not shown.

c) Variable region isolated from the oligos MHV8 and MHV12

The DNA sequences obtained with these two oligos are identical, apart from the sequence encoded by the oligo itself. This sequence is a novel sequence coding for a functional heavy chain presumed to be that of the monoclonal antibody 7C10. The DNA (SEQ ID Nos. 51 and 53) and amino acid (SEQ ID No. 52) sequences of the cDNA coding for 7C10 VH are represented in figure 15.

Example 9: Construction of chimeric mouse-man genes

The chimeric antibody 7C10 was constructed so as to have the mouse 7C10 regions VL and VH connected to the human constant regions kappa and gamma-1, respectively. Oligos were used in order to modify the 5' and 3' ends of the sequences flanking the DNA coding for 7C10 VL and VH in order to allow their cloning in vectors for expression in mammalian cells. These vectors use the strong promoter HCMV in order effectively to transcribe the heavy and light chains of the chimeric antibody 7C10. On the other hand, these vectors likewise contain the replication origin of SV40 allowing an effective replication of the DNA and, as a consequence, as a transitory expression of the proteins in cos cells.

Example 10: Expression and evaluation of the recognition activity of the IGF1 receptor of the chimeric antibody 7C10

The two plasmids containing the DNA coding for the chimeric 7C10 antibody were cotransfected in cos-7 cells (ATCC number CRL-1651) in order to study the transitory expression of the recombinant antibody. After incubation for 72 hours, the culture medium was removed, centrifuged in order to eliminate the cell debris and analyzed by the ELISA technique for the production of human IgG1 (see Example 16) and the recognition of the receptor for IGF1 (see Example 17).

The ELISA tests for measurement of concentrations of human IgG1/Kappa showed that the expression of the chimeric antibody 7C10 in the cos-7 cells was between 300 and 500 ng/mm, which is comparable to the values obtained with the majority of antibodies.

The ELISA tests for recognition of the receptor for IGF1 show that the chimeric antibody recognizes it specifically and with a good relative avidity (see figures 3A, 3B and 3C). This provides the functional proof that the good VH and VL of the 7C10 antibody have been identified. In addition, this chimeric form of 7C10 appears as being an indispensable tool in the evaluation of the affinity of the humanized forms.

Example 11: Molecular modeling of the variable regions of the mouse antibody 7C10

In order to assist and to refine the humanization process by "CDR grafting", a

molecular model of the VL and VH regions of the mouse antibody 7C10 was constructed. The model is based on the crystallographic structure of the heavy chain 1AY1 and of the light chain 2PCP.

Example 12: Process of humanization by CDR grafting of the variable region of the light chain of the antibody 7C10 (7C10 VL)

a) Comparison of the amino acid sequence of 7C10 VL with all the known mouse VL sequences

As a preliminary step to humanization by CDR grafting, the amino acid sequence of 7C10 VL was first compared with all the mouse VL sequences present in the databank of Kabat (Internet address: ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/database/kabat/fasta_format/, last update of data dates from 1999). 7C10 VL has thus been identified as belonging to the subgroup II of the Kappa light chains as defined by Kabat et al. (In *Sequences of proteins of immunological interest* (5th edn.), NIH publication No. 91-3242, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, 1991). The VL regions of monoclonal antibodies of mice having a sequence identity ranging up to 95% have been identified (DRB1-4.3 (SEQ ID No. 55): 95% and C94-5B11'CL (SEQ ID No. 56): 95%, see figure 17). In order to attempt to identify the out of the ordinary residues in the 7C10 VL sequence, the amino acid sequence of 7C10 VL (SEQ ID No. 54) was aligned with the consensus sequence of the subgroup II of the mouse kappa chains (SEQ ID No. 57) as defined by Kabat (see figure 17).

In the Kabat position number 3, the valine (V) normally present in the subgroup II of the Kappa light chains according to Kabat (71%) is replaced by a leucine (L). A leucine in this position is not rare since it is found, for example, in DRB1-4.3 and C94-5B11'CL. According to the molecular model, this residue does not seem to play a particular role. Consequently, the conservation of this residue in the humanized form will not be envisaged.

In the Kabat position number 7, the threonine (T) normally present in the subgroup II of the Kappa light chains according to Kabat (66%) is replaced by an isoleucine (I). An isoleucine in this position is relatively rare since it is only found 15

times among all the mouse VL sequences known and never among human VL sequences. The molecular model shows that this residue (17) points toward the surface of the molecule but does not contact the CDRs (the residue of a CDR which is the closest would be the arginine in Kabat position number 42). In addition, it does not seem very probable that this residue 17 directly contacts the antigen. Consequently, the conservation of this residue in the humanized form will not be envisaged, at any rate at first.

In the Kabat position number 77, the arginine (R) normally present in the subgroup II of the Kappa light chains according to Kabat (95.5%) is replaced by a serine (S). A serine in this position is not rare.

b) Comparison of the amino acid sequence of 7C10 VL with all the known human VL sequences

In order to identify the best human candidate for the "CDR grafting", the Kappa VL region of human origin having the greatest homology possible with 7C10 VL was sought. To this end, the amino acid sequence of mouse kappa 7C10 VL was compared with all the human Kappa VL sequences present in the database of Kabat. Mouse 7C10 VL had the greatest sequence homology with the human kappa VL regions of subgroup II as defined by Kabat et al. (1991). VH regions of monoclonal antibodies of human origin have been identified having a sequence identity ranging up to 75.9% (GM607 (SEQ ID No. 58), see figure 18) over the whole of the 112 amino acids composing the variable region. A germinal line of human origin, DPK15/A19 (SEQ ID No. 59), having a sequence identity of 76% (see figure 18) was also identified, GM607 (Klobeck et al., 1984). GM607 was therefore chosen as a human sequence receptive of CDRs (according to the definition of Kabat) of mouse 7C10 VL. By comparing the GM607 sequences with that of the consensus sequence of the human subgroup II (SEQ ID No. 60) (figure 18), no particular residue in the framework regions (Rch) could be identified, indicating by the same fact that GM607 was a good candidate for CDR grafting.

c) Humanized versions of 7C10 VL

The following stage in the humanization process consisted in joining the CDRs of mouse 7C10 VL to the framework regions (Rch) of the human light chain selected,

GM607 (Klobeck et al., 1984). At this stage of the process, the molecular model of the mouse Fv regions of 7C10 is particularly useful in the choice of the mouse residues to be conserved as being able to play a role either in the maintenance of the tridimensional structure of the molecule (canonical structure of the CDRs, VH/VL interface, etc.) or in the binding to the antigen. In the Rchs, each difference between the mouse (7C10 VL) and human (GM607) amino acids was examined scrupulously (see Table 6). In addition, the particular residues in the mouse sequence 7C10 VL which were identified (see example 12.a) were taken into account if needed.

In the first version humanized by "CDR grafting" of 7C10 VL, human 1, a single change in the framework regions (Rch) of GM607 was carried out. This change concerns the residue 2 (nomenclature of Kabat) situated in Rch 1. This residue enters in effect into the composition of the canonical structure of the CDR 1 of 7C10 VL and could therefore be critical for maintaining this loop in its good conformation. The valine present in this position in the mouse 7C10 VL sequence is thus conserved in this same position in the humanized form (see Table 6 and figure 19 for the amino acid sequence (SEQ ID No. 61) and figure 20 for the DNA sequence (SEQ ID Nos. 62 and 64) and the amino acid sequence comprising the peptide signal (SEQ ID No. 63).

In the second version humanized by "CDR grafting" of 7C10 VL, human 2, no change in the Rchs of the human light chain GM607 has been made. All the residues of the Rchs are thus of human origin including the residue 2 which has therefore been mutated in order to replace the valine present in mouse 7C10 VL by an isoleucine found in this same position in the human light chain GM607 (see Table 6 and figure 19 for the amino acid sequence (SEQ ID No. 65) and figure 21 for the DNA sequence (SEQ ID Nos. 66 and 68) and the amino acid sequence comprising the peptide signal (SEQ ID No. 67)). This human form 2 is therefore totally humanized (apart from, of course, CDRs themselves) since all the residues of the Rchs are those of the light chain of human origin, GM607.

TABLE 6: Alignment of the amino acid sequences leading to the design of the remodeled human 7C10 V_L regions

Kabat	#	FR or CDR	Mouse light chain 7C10	Human germinal line DPK15/A19	GM 607	Remodeled human 7C10 1	Remodeled human 7C10 2	Comments
1	1	FR1	D	D	D	D	D	
2	2	|	V*	I*	I*	V*	I*	Cano L1 4(16) Vernier zone
3	3	|	L	V	V	V	V	
4	4	|	M	M	M	M	M	Vernier zone
5	5	|	T	T	T	T	T	
6	6	|	Q	Q	Q	Q	Q	
7	7	|	I	S	S	S	S	
8	8	|	P	P	P	P	P	
9	9	|	L	L	L	L	L	
10	10	|	S	S	S	S	S	
11	11	|	L	L	L	L	L	
12	12	|	P	P	P	P	P	
13	13	|	V	V	V	V	V	
14	14	|	S	T	T	T	T	
15	15	|	L	P	P	P	P	
16	16	|	G	G	G	G	G	
17	17	|	D	E	E	E	E	
18	18	|	Q	P	P	P	P	
19	19	|	A	A	A	A	A	
20	20	|	S	S	S	S	S	
21	21	|	I	I	I	I	I	
22	22	|	S	S	S	S	S	
23	23	FR1	C	C	C	C	C	
24	24	CDR1	R	R	R	R	R	
25	25	|	S*	S*	S*	S*	S*	Cano L1 4(16)
26	26	|	S	S	S	S	S	
27	27	|	Q	Q	Q	Q	Q	
27A	28	|	S	S	S	S	S	
27B	29	|	I*	L*	L*	I*	I*	Cano L1 4(16)
27C	30	|	V	L	L	I	I	
27D	31	|	H	H	H	H	H	
27E	32	|	S	S	S	S	S	
28	33	|	N	N	N	N	N	
29	34	|	G	G	G	G	G	
30	35	|	N	Y	Y	n	N	
31	36	|	T	N	N	t	T	
32	37	|	Y	Y	Y	Y	Y	
33	38	|	L*	L*	L*	L*	L*	Cano L1 4(16)
34	39	CDR1	Q	D	D	q	Q	

35	40	FR2	W	W	W	W	W	Vernier zone
36	41	|	Y	Y	Y	Y	Y	VH/VL inter Vernier zone
37	42	|	L	L	L	L	L	
38	43	|	Q	Q	Q	Q	Q	VL/VH inter
39	44	|	K	K	K	K	K	
40	45	|	P	P	P	P	P	
41	46	|	G	G	G	G	G	
42	47	|	Q	Q	Q	Q	Q	
43	48	|	S	S	S	S	S	
44	49	|	P	P	P	P	P	VL/VH inter (+)
45	50	|	K	Q	Q	Q	Q	
46	51	|	L	L	L	L	L	VL/VH inter Vernier zone
47	52	|	L	L	L	L	L	Vernier zone
48	53	|	I	I	I	I*	I*	Cano L2 1(7) Vernier zone
49	54	FR2	Y	Y	Y	Y	Y	Vernier zone
50	55	CDR2	K	L	L	k	K	
51	56	|	V*	G*	G*	v*	v*	Cano L2 1(7)
52	57	|	S*	S*	S*	S*	S*	Cano L2 1(7)
53	58	|	N	N	N	N	N	
54	59	|	R	R	R	R	R	
55	60	|	L	A	A	l	L	
56	61	CDR2	Y	S	S	y	Y	
57	62	FR3	G	G	G	G	G	
58	63	|	V	V	V	V	V	
59	64	|	P	P	P	P	P	
60	65	|	D	D	D	D	D	
61	66	|	R	R	R	R	R	
62	67	|	F	F	F	F	F	
63	68	|	S	S	S	S	S	
64	69	|	G*	G*	G*	G*	G*	Cano L2 1(7) Vernier zone
65	70	|	S	S	S	S	S	
66	71	|	G	G	G	G	G	Vernier zone
67	72	|	S	S	S	S	S	
68	73	|	G	G	G	G	G	Vernier zone
69	74	|	T	T	T	T	T	Vernier zone
70	75	|	D	D	D	D	D	
71	76	|	F*	F*	F*	F*	F*	Cano L1 4(16) Vernier

								zone
72	77		T	T	T	T	T	
73	78		L	L	L	L	L	
74	79		K	K	K	K	K	
75	80		I	I	I	I	I	
76	81		S	S	S	S	S	
77	82		S	R	R	R	R	
78	83		V	V	V	V	V	
79	84		E	E	E	E	E	
80	85		A	A	A	A	A	
81	86		E	E	E	E	E	
82	87		D	D	D	D	D	
83	88		L	V	V	V	V	
84	89		G	G	G	G	G	
85	90		V	V	V	V	V	
86	91		Y	Y	Y	Y	Y	
87	92		Y	Y	Y	Y	Y	VL/VH inter
88	93	FR3	C	C	C	C	C	
89	94	CDR3	F	M	M	f	F	VL/VH inter
90	95	|	Q*	Q*	Q*	Q*	Q*	Cano L3 1(9)
91	96		G	A	A	g	G	VL/VH inter
92	97		S	L	L	s	S	
93	98		H	Q	Q	h	H	
94	99		V	T	T	v	V	
95	100	|	P*	P*	P*	P*	P*	Cano L3 1(9)
96	101	|	W		Q	w	W	VL/VH inter (+)
97	102	CDR3	T		T	T	T	
98	103	FR4	F		F	F	F	VL/VH inter (+) Vernier zone
99	104		G		G	G	G	
100	105		G		Q	Q	Q	
101	106		G		G	G	G	
102	107		T		T	T	T	
103	108		K		K	K	K	
104	109		L		V	V	V	
105	110		E		E	E	E	
106	111		I		I	I	I	
107	112	FR4	K		K	K	K	

Legend: The first column (Kabat) indicates the position of the amino acid residue according to Kabat et al. (1991); the second column (#) indicates the position of the amino acid residue in the regular sequence; the third column (FR or CDR) was made in order easily to identify the segments of the skeleton (FR1, FR2, FR3 and FR4) and the CDR segments (CDR1, CDR2 and CDR3) ("CDR" for "Complementarity-Determining Region") with the three CDRs separating the four FRs; the fourth column (Mouse light

chain 7C10) represents the amino acid sequence (SEQ ID No. 54) of the V_L region of mouse antibody 7C10; the fifth column (Human germinal line DPK15/A19) represents the amino acid sequence (SEQ ID No. 59) of the kappa II human V light chain of the germinal line; the sixth column (GM607) represents the amino acid sequence (SEQ ID No. 58) of the V_L region of the human antibody GM607; the seventh and eighth columns (remodeled human 7C10 1 and 2) represent the amino acid sequences of the humanized 1 and 2 antibody 7C10 VL (respectively SEQ ID Nos. 61 and 65). "*" indicates the parts of the canonical structure of the CDR loop such as defined by Chothia et al. (Nature, 342, 877-883, 1989).

Example 13: Process of humanization by CDR grafting of the variable region of the heavy chain of the antibody 7C10 (7C10 VH)

a) Comparison of the amino acid sequence of 7C10 VH with all of the known mouse VH sequences

As a preliminary stage in humanization by CDR grafting, the amino acid sequence of 7C10 VH was first compared with all the mouse VH sequences present in the Kabat databank (Internet address: ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/database/kabat/fasta_format/, last update of data dates from 1999). 7C10 VH has thus been identified as belonging to the subgroup I(A) of the heavy chains as defined by Kabat et al. (1991). VH regions of mouse monoclonal antibodies having a sequence identity ranging up to 90.5% were identified (AN03'CL (SEQ ID No. 70), see figure 22). In order to attempt to identify the out of the ordinary residues in the sequence of 7C10 VH, we aligned the amino acid sequence of 7C10 VH (SEQ ID No. 69) with the consensus sequence (SEQ ID No. 71) of the subgroup I(A) of the mouse heavy chains as defined by Kabat (see figure 22).

Residue 17 (Kabat's numbering), Thr for the consensus sequence of subgroup I(A) and Ser in 7C10 VH, is located on the surface of the molecule with respect to the interface with the constant region. This residue does not seem to be important.

Residue 27 (Kabat's numbering), Asp for the consensus sequence of subgroup I(A) and Tyr in 7C10 VH, is a canonical residue for the CDR 1. Tyr in this position is not rare and is probably critical for maintaining CDR 1 in its good conformation.

Residue 84 (Kabat's numbering), Thr for the consensus sequence of the

subgroup I(A) and Asn in 7C10 VH. Asn was found 93 times in mouse VH and 3 times in human VH. According to the molecular model, it is a surface residue remote from the paratope.

The numbering of the amino acids is that of Kabat et al. (1991). The residues in the framework regions (apart from CDRs) which differ between 7C10 VH and Kabat mouse subgroup I(A) are underlined. AN03'CL represents the sequence of the heavy chain of a mouse antibody (access number in the Kabat databank is P001289).

b) Comparison of the amino acid sequence of 7C10 VH with all of the known human VH sequences

In order to identify the best human candidate for the "CDR grafting", the VH region of human origin having the greatest possible homology with 7C10 VH was sought. To this end, the amino acid sequence of mouse 7C10 VH was compared with all the human VH sequences present in the Kabat databank. Mouse 7C10 VH had the greatest sequence homology with the human VH regions of the subgroup II as defined by Kabat et al. (1991). VH regions of monoclonal antibodies of human origin were identified having a sequence identity ranging up to 67.3% (human VH FUR1'CL (SEQ ID No. 73, see figure 23) over the whole of the 98 amino acids encoded by the variable gene (that is to say apart from CDR3 and region J). A germinal line of human origin, 4.22 VH IV (Sanz et al., 1989), having a sequence identity of 68.4%, according to the same criteria as for VH FUR1'CL, was also identified (human Germ-line (SEQ ID No. 74), see figure 23). The sequence encoded by the germinal line 4.22 VH IV was chosen as a human sequence receptive of the CDRs (according to the definition of Kabat) of mouse 7C10 VH rather than VH FUR1'CL because in comparing the sequences of 4.22 VH IV and VH FUR1'CL with that of the consensus sequence of the human subgroup II (human Kabat sg II (SEQ ID No. 72), see figure 23 and table 7), no atypical residue in the framework regions (Rch) could be identified for 4.22 VH IV although the presence of two atypical residues (Gln and Arg in positions 81 and 82A according to the nomenclature of Kabat, respectively) were identified in the sequence encoded by VH FUR1'CL.

c) Humanized versions of 7C10 VH

The following stage in the humanization process consisted in joining the CDRs of mouse 7C10 VH to the framework regions (Rch) of the human germinal line 4.22

VH IV (Sanz et al., 1989). At this stage of the process, the molecular model of the mouse Fv regions of 7C10 is particularly useful in the choice of the mouse residues to be conserved as being able to play a role in the maintenance of the tridimensional structure of the molecule (canonical structure of the CDRs, VH/VL interface, etc.) or in the binding to the antigen (belonging to the paratope). In the Rchs, each difference between the mouse (7C10 VH) and human (4.22 VH IV) amino acids was examined scrupulously (see Table 7). In addition, the particular residues in the mouse 7C10 VH sequence which had been identified (see Example 8.a) were taken into account if needed.

In the first version of 7C10 VH humanized by "CDR grafting", humanized 1, four changes in the framework regions (Rch) of 4.22 VH IV were carried out (see Table 7, figure 24 for the amino acid sequence (SEQ ID No. 75) and figure 25 for the DNA sequence (SEQ ID Nos. 76 and 78) and the amino acid sequence comprising the peptide signal (SEQ ID No. 77)). These four changes concern:

- Residue 30 (Kabat's nomenclature) situated in Rch 1. This residue enters in effect into the structural composition of the CDR1 of 7C10 VH (as defined by Chothia et al., 1989) and could therefore be critical for maintaining this loop in its correct conformation. The Thr present in this position in the mouse sequence 7C10 VH is therefore conserved in this same position in the humanized form.
- Residue 48 (Kabat's nomenclature) situated in Rch 2. This residue is close to the CDRs, although according to the molecular model not in direct contact with the latter, and could influence their ultimate conformation. The methionine present in this position in the mouse sequence 7C10 VH is therefore conserved in this same position in the humanized form 1.
- Residue 67 (Kabat's nomenclature) situated in Rch 3. This residue is close to the CDRs and according to the molecular model could contact Lysine 60 (Kabat's nomenclature) in the CDR 2. The isoleucine present in this position in mouse sequence 7C10 VH is therefore conserved in this position in the humanized form 1.
- Residue 71 (Kabat's nomenclature) situated in Rch 3. This residue is part of the canonical structure of the CDR 2 and should therefore be critical for maintaining this loop in its correct conformation. The arginine present in this position in the

mouse sequence 7C10 VH is therefore conserved in this position in the humanized form 1.

In the second version of 7C10 VH humanized by "CDR grafting", humanized 2, two changes in the framework regions (Rch) of 4.22 VH IV were carried out. These two changes concern the residues 30 and 71 (Kabat's nomenclature), already described in the humanized form 1 (see Table 7, figure 24 for the amino acid sequence (SEQ ID No. 79) and figure 26 for the DNA sequence (SEQ ID Nos. 80 and 82) and the amino acid sequence comprising the peptide signal (SEQ ID No. 81)).

In the third form of 7C10 VH humanized by "CDR grafting", humanized 3, no change in the framework regions (Rch) of 4.22 VH IV was carried out. All the residues of the Rchs are therefore of human origin including the residues 30, 48, 67 and 71 (Kabat's nomenclature) which have been conserved (see Table 7, figure 24 for the amino acid sequence (SEQ ID No. 83) and figure 27 for the DNA sequence (SEQ ID Nos. 84 and 86) and the amino acid sequence comprising the peptide signal (SEQ ID No. 85)). This humanized form 3 is therefore totally humanized (apart, of course, from the CDRs themselves as defined by Kabat) since all the residues of the Rchs are those encoded by the VH gene of the germinal line 4.22 VH IV.

TABLE 7: Alignment of the amino acid sequences leading to the design of the remodeled human 7C10 V_H regions

Kabat	FR ou CDR	Chaîne lourde 7C10 de souris	Lignée germinale 4.22 VH IV	FUR1'CL VH humain	7C10 H humain 1 refaçonné	7C10 H humain 2 refaçonné	7C10 H humain 3 refaçonné	Commentaires
1	FR1	D	Q	Q	Q	Q	Q	
2	|	V	V	V	V	V	V	Zone Vernier
3	|	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
4	|	L	L	L	L	L	L	
5	|	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
6	|	E	E	E	E	E	E	
7	|	S	S	S	S	S	S	
8	|	G	G	G	G	G	G	
9	|	P	P	P	P	P	P	
10	|	G	G	G	G	G	G	
11	|	L	L	L	L	L	L	
12	|	V	V	V	V	V	V	
13	|	K	K	K	K	K	K	
14	|	P	P	P	P	P	P	
15	|	S	S	S	S	S	S	
16	|	Q	E	E	E	E	E	
17	|	S	T	T	T	T	T	
18	|	L	L	L	L	L	L	
19	|	S	S	S	S	S	S	
20	|	L	L	L	L	L	L	
21	|	T	T	T	T	T	T	
22	|	C	C	C	C	C	C	
23	|	S	T	T	T	T	T	
24	|	V	V	V	V*	V*	V*	H1 2(6) canonique

25		T	S	S	S	S	S	
26		G*	G*	G*	G*	G*	G*	H1 2(6) canonique
27		Y*	Y*	Y*	Y*	Y*	Y*	H1 2(6) canonique Zone Vernier
28		S	S	S	S	S	S	Zone Vernier
29		I*	I*	I*	I*	I*	I*	H1 2(6) canonique Zone Vernier
30	FR1	T	S	S	t	T	S	Zone Vernier Proche des CDRs
31	CDR1	G	S	S	g	G	g	
32		G	G	G	G	G	G	
33		Y	Y	Y	Y	Y	Y	
34		L	Y	Y	l	L	l	
35		W*	W*	W*	W*	W*	W*	H1 2(6) canonique VH/VL interface
35A	CDR1	N	G	G	n	N	n	
36	FR2	W	W	W	W	W	W	
37		I	I	I	I	I	I	VH/VL interface
38		R	R	R	R	R	R	
39		Q	Q	Q	Q	Q	Q	VH/VL interface
40		P	P	P	P	P	P	
41		P	P	P	P	P	P	
42		G	G	G	G	G	G	
43		N	K	K	K	K	K	
44		K	G	G	G	G	G	
45		L	L	L	L	L	L	VH/VL interface (+)
46		E	E	E	E	E	E	
47		W	W	W	W	W	W	VH/VL interface Zone Vernier
48		M	I	I	m	I	I	Zone Vernier Proche des CDRs
49	FR2	G	G	G	G	G	G	Zone Vernier

50	CDR2	Y	S	S	y	Y	y	Zone Vernier
51	|	I	I	M	I	I	I	
52	|	S	Y	F	s	S	s	
53	|	Y	H	H	y	Y	y	
54	|	D	S	S	d	D	d	
55	|	G*	G*	G*	G*	G*	G*	H2 1(16) canonique
56	|	T	S	S	t	T	t	
57	|	N	T	S	n	N	n	
58	|	N	Y	Y	n	N	n	
59	|	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
60	|	K	N	N	k	K	k	
61	|	P	P	P	P	P	P	
62	|	S	S	S	S	S	S	
63	|	L	L	L	L	L	L	
64	|	K	K	K	K	K	K	
65	CDR2	D	S	S	d	d	d	
66	FR3	R	R	R	R	R	R	
67	|	I	V	V	i	V	V	Zone Vernier Proche des CDRs
68	|	S	T	T	T	T	T	
69	|	I	I	I	I	I	I	Zone Vernier
70	|	T	S	S	S	S	S	
71	|	R*	V*	V*	r*	r*	V*	H2 1(16) canonique Zone Vernier
72	|	D	D	D	D	D	D	
73	|	T	T	T	T	T	T	Zone Vernier
74	|	S	S	S	S	S	S	
75	|	K	K	K	K	K	K	
76	|	N	N	N	N	N	N	
77	|	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
78	|	F	F	F	F	F	F	Zone Vernier
79	|	F	S	S	S	S	S	
80	|	L	L	L	L	L	L	

81		K	K	Q	K	K	K	
82		L	L	L	L	L	L	
82A		N	S	R	S	S	S	
82B		S	S	S	S	S	S	
82C		V	V	V	V	V	V	
83		T	T	T	T	T	T	
84		N	A	A	A	A	A	
85		E	A	A	A	A	A	
86		D	D	D	D	D	D	
87		T	T	T	T	T	T	
88		A	A	A	A	A	A	
89		T	V	V	V	V	V	
90		Y	Y	Y	Y	Y	Y	
91		Y	Y	Y	Y	Y	Y	VH/VL interface
92		C	C	C	C	C	C	
93		A	A	A	A	A	A	VH/VL interface Zone Vernier
94	FR3	R*	R*	R*	R*	R*	R*	H1 2(6) canonique Zone Vernier
95	CDR3	Y		G	y	y	y	VH/VL interface
96		G		R	g	g	g	
97		R		Y	r	r	r	
98		V		C	v	v	v	
99		F		S	f	f	f	
100				S				
100A				T				
100B				S				
100C				C				
100D				N				
100 E				W				
100K		F		F	f	f	f	VH/VL interface (+)
101		D		D	d	d	d	
102	CDR3	Y		P	y	y	y	

103	FR4	W		W	W	W	W	VH/VL interface (+) Zone Vernier
104		G		G	G	G	G	
105		Q		Q	Q	Q	Q	
106		G		G	G	G	G	
107		T		T	T	T	T	
108		T		L	L	L	L	
109		L		V	V	V	V	
110		T		T	T	T	T	
111		V		V	V	V	V	
112		S		S	S	S	S	
113	FR4	S		S	S	S	S	

Legend: The first column (Kabat) indicates the position of the amino acid residue according to Kabat et al. (1991); the second column (FR or CDR) was made in order easily to identify the segments of the skeleton (FR1, FR2, FR3 and FR4) and the CDR segments (CDR1, CDR2 and CDR3) with the three CDRs separating the four FRs; the third column (Mouse heavy chain 7C10) represents the amino acid sequence (SEQ ID No. 69) of the V_H region of the mouse antibody 7C10; the fourth column (Germinal line 4.22 VH IV) represents the amino acid sequence of the gene 4.22 VH IV (Sanz et al., 1989) (SEQ ID No. 74); the fifth column (human FUR1'CL VH, kabat accession number N020619) represents the amino acid sequence (SEQ ID No. 73) [lacuna] IgM*K* antilamin B of human origin (Mariette et al., 1993); the sixth, seventh and eighth columns (remodeled human 7C10 1, 2 and 3) represent the amino acid sequences of the V_H region of remodeled human 7C10 respectively for the versions 1 (SEQ ID No. 75), 2 (SEQ ID No. 79) and 3 (SEQ ID No. 83). "*" indicates the parts of the canonical structure of the CDR loop such as defined by Chothia et al. (1989).

Example 14: Construction of the genes coding for the humanized versions 1 of 7C10 VL and VH by assembly of oligonucleotides

a) Principle

The genes (leader peptide + variable regions VDJ for VH or VJ for VK) coding for the humanized variable regions were synthesized by solid-phase assembly on magnetic beads coated with streptavidin. The genes coding for humanized 7C10 VH (445 base pairs) and humanized 7C10 VL (433 base pairs) are constructed by fusing two fragments of DNA owing to the presence of a KpnI restriction site present in the two sequences and situated almost halfway along the gene (at 200 and 245 nucleotides with respect to the 5' end of the gene for VL and VH, respectively). The two fragments which are fused together are themselves assembled by an assembly technique which consists in using phosphorylated oligonucleotides (approximately 30-35 mer) hybridized two by two (one oligo sense and the other antisense, with a homology of approximately 50%) in such a way that they overlap during elongation. A first oligonucleotide biotinylated in the 5' position is attached to the magnetic beads and then the pairs of phosphorylated oligonucleotides are added one by one. The phosphodiester linkage between the juxtaposed phosphorylated oligonucleotides is produced by the enzyme T4 DNA ligase.

The genes thus synthesized *de novo* can be cloned directly (by digestion with restriction enzymes compatible with the expression vector chosen) or amplified by PCR in order to obtain more material as a prelude to directional cloning by enzymatic digestion. The sequence of the gene thus constructed by *de novo* assembly is then verified by automatic sequencing of the DNA.

b) Experimental protocol of the *de novo* assembly technique

Oligonucleotides phosphorylated in the 5' position or biotinylated in the 5' position whose concentration was adjusted to 100 μM were ordered from MWG Biotech (see the sequences of the oligonucleotides used in Table 7 for the construction of humanized 7C10 VL, and Table 9 for the construction of humanized 7C10 VH). The oligonucleotides were hybridized in pairs (an equimolar mixture, 500 pmol, of a sense oligo and of an antisense oligo in the buffer T4 DNA ligase is heated to 95°C for 5 minutes and then allowed to cool on the bench to ambient temperature) according to a scheme described in Table 10.

The first biotinylated oligonucleotide is attached to magnetic beads coated with streptavidin (Dynabeads M-280 streptavidin, Dynal product No. 112-05). For this, 500 pmol of the biotinylated oligonucleotide in a 15 mM NaCl solution are added to 50 μl of the decanted beads (use of a magnet holder) previously washed twice with 100 μl of TE 1X buffer (Tris-EDTA 100X buffer: 1 M Tris-HCl, pH 8, 0.1 M EDTA, Sigma T-9285). After incubation at 37°C for 15 min, the beads are washed twice with the wash buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM EDTA and 50 mM NaCl) and the pairs of hybridized oligo-nucleotides are then added one by one. On each readdition of a pair of oligonucleotides, the mixture is heated to 95°C for 5 min and then allowed to cool on the bench to ambient temperature. Once ambient temperature is reached, 2 μl of 10 U/μl T4 DNA ligase (Biolabs) are added and the mixture is incubated for 20 min at 37°C. The beads are then washed (wash buffer) and the following pairs of oligonucleotides are then added in succession.

The last unpaired oligo (antisense) is assembled in the following fashion. 5 μl of oligo (500 pmol) and 43 μl of T4 DNA ligase buffer are added to the decanted beads, then the mixture is heated to 95°C for 5 min and allowed to cool on the bench to ambient temperature. Once ambient temperature is reached, 2 μl of T4 DNA ligase are added and the mixture is incubated at 37°C for 20 min. The beads are then washed twice

with wash buffer and then twice with TE 1X buffer.

The beads can then be conserved at 4°C before proceeding to the cloning and sequencing of the gene assembled *de novo*.

TABLE 8: DNA sequence of oligonucleotides used for the construction of humanized 7C10 VL 1 by *de novo* assembly

LeaderMluI.biotin	5'-GTCAGAACGCGTGCCGCC	(SEQ ID No. 87)
7C10Lresh.1sens	5'-ACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT	(SEQ ID No. 88)
7C10Lresh.2sens	5'-GATGTTCTGGTTTCCTGCTTCCAGCAGTGATG	(SEQ ID No. 89)
7C10Lresh.3sens	5'-TTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCC	(SEQ ID No. 90)
7C10Lresh.4sens	5'-GTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTG	(SEQ ID No. 91)
7C10Lresh.5sens	5'-CAGGTCTAGTCAGACCATTATACATAGTAATG	(SEQ ID No. 92)
7C10Lresh.6sens	5'-GAAACACCTATTTGGAATGGTACCTGCAGA	(SEQ ID No. 93)
7C10Lresh.7anti	5'-GGCAACTTCATGGTGGCGGCACGCGTTCTGAC	(SEQ ID No. 94)
7C10Lresh.8anti	5'-GAAACCAGAACATCAGCACCAACAGCCTAACA	(SEQ ID No. 95)
7C10Lresh.9anti	5'-CTGAGTCATCACAACATCACTGCTGGAAGCAG	(SEQ ID No. 96)
7C10Lresh.10anti	5'-TCTCCAGGGGTGACGGGCAGGGAGAGTGGAGA	(SEQ ID No. 97)
7C10Lresh.11anti	5'-TCTGACTAGACCTGCAGGAGATGGAGGCCGGC	(SEQ ID No. 98)
7C10Lresh.12anti	5'-AAATAGGTGTTTCCATTACTATGTACAATGC	(SEQ ID No. 99)
7C10Lresh.13sens	5'-CAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATAAA	(SEQ ID No. 100)
7C10Lresh.14sens	5'-GTTTCTAATCGGCTTTATGGGGTCCCTGACAG	(SEQ ID No. 101)
7C10Lresh.15sens	5'-GTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTA	(SEQ ID No. 102)
7C10Lresh.16sens	5'-CACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGAT	(SEQ ID No. 103)
7C10Lresh.17sens	5'-GTTGGGGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTCACA	(SEQ ID No. 104)
7C10Lresh.18sens	5'-TGTTCCGTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGG	(SEQ ID No. 105)
7C10Lresh.19sens	5'-TGGAAATCAAACGTGAGTGGATCCTCTGCG	(SEQ ID No. 106)
7C10Lresh.KpnIREV	5'-TCTGCAGGTACCATTGC	(SEQ ID No. 107)
7C10Lresh.KpnIbiotin	5'-TGCAATGGTACCTGCAGAAGC	(SEQ ID No. 108)
7C10Lresh.20anti	5'-AGACTGCCCTGGCTTCTGCAGGTACCATTGCA	(SEQ ID No. 109)
7C10Lresh.21anti	5'-CGATTAGAAACTTTATAGATCAGGAGCTGTGG	(SEQ ID No. 110)
7C10Lresh.22anti	5'-TGCCACTGAACCTGTCAGGGACCCCATAAAGC	(SEQ ID No. 111)
7C10Lresh.23anti	5'-GATTTTCAGTGTAAAATCTGTGCCTGATCCAC	(SEQ ID No. 112)
7C10Lresh.24anti	5'-TAAACCCCAACATCCTCAGCCTCCACTCTGCT	(SEQ ID No. 113)
7C10Lresh.25anti	5'-TCCACGGAACATGTGAACCTTGAAAGCAGTAA	(SEQ ID No. 114)
7C10Lresh.26anti	5'-TTTGATTTCCACCTTGGTCCCTTGGCCGAAC	(SEQ ID No. 115)
7C10Lresh.BamHIantisens	5'-CGCAGAGGATCCACTCACG	(SEQ ID No. 116)

TABLE 9: DNA sequence of oligonucleotides used for the construction of humanized 7C10 VH 1 by *de novo* assembly

LeaderMluI.biotin	5'-GTCAGAACGCGTGCCGCC	(SEQ ID No. 117)
7C10Hresh.1sens	5'-ACCATGAAAGTGTTGAGTCTGTTGTACCTCTTGA	(SEQ ID No. 118)
7C10Hresh.2sens	5'-CAGCCATTCCTGGTATCCTGTCTCAGGTGCAGCT	(SEQ ID No. 119)
7C10Hresh.3sens	5'-TCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG	(SEQ ID No. 120)
7C10Hresh.4sens	5'-GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGT	(SEQ ID No. 121)
7C10Hresh.5sens	5'-TACTCCATCACCGGTGGTTATTTATGGAACTGG	(SEQ ID No. 122)
7C10Hresh.6sens	5'-ATACGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGG	(SEQ ID No. 123)
7C10Hresh.7sens	5'-ATGGGGTATATCAGCTACGACGGTACCAATAAC	(SEQ ID No. 124)
7C10Hresh.8antisens	5'-TCAACACTTTCATGGTGGCGGCACGCGTTCTGAC	(SEQ ID No. 125)
7C10Hresh.9antisens	5'-ATACCAGGAATGGCTGTCAAGAGGTACAACAGAC	(SEQ ID No. 126)
7C10Hresh.10antisens	5'-TGGGCCCGACTCCTGAAGCTGCACCTGAGACAGG	(SEQ ID No. 127)
7C10Hresh.11antisens	5'-TGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGCTTCACCAGTCC	(SEQ ID No. 128)
7C10Hresh.12antisens	5'-CCACCGGTGATGGAGTAACCAGAGACAGTGCAGG	(SEQ ID No. 129)
7C10Hresh.13antisens	5'-CCCTGGGGGCTGCCGTATCCAGTTCCATAAATAA	(SEQ ID No. 130)
7C10Hresh.14antisens	5'-TAGCTGATATACCCCATCCACTCCAGTCCCTT	(SEQ ID No. 131)
7C10Hresh.KpnIREV	5'-GTTATTGGTACCGTCG	(SEQ ID No. 132)
7C10Hresh.KpnIbiotin	5'-TACGACGGTACCAATAACTAC	(SEQ ID No. 133)
7C10Hresh.15sens	5'-AAACCCTCCCTCAAGGATCGAATCACCATATC	(SEQ ID No. 134)
7C10Hresh.16sens	5'-ACGTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA	(SEQ ID No. 135)
7C10Hresh.17sens	5'-AGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACTGCA	(SEQ ID No. 136)
7C10Hresh.18sens	5'-GTGTATTACTGTGCGAGATACGGTAGGGTCTT	(SEQ ID No. 137)
7C10Hresh.19sens	5'-CTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCA	(SEQ ID No. 138)
7C10Hresh.20sens	5'-CCGTCTCCTCAGGTGAGTGGATCCTCTGCG	(SEQ ID No. 139)
7C10Hresh.21antisens	5'-AGGGAGGGTTTGTAGTTATTGGTACCGTCGTA	(SEQ ID No. 140)
7C10Hresh.22antisens	5'-ACGTGTCACGTGATATGGTGATTCGATCCTTG	(SEQ ID No. 141)
7C10Hresh.23antisens	5'-AGAGCTCAGCTTCAGGGAGAACTGGTTCTTGG	(SEQ ID No. 142)
7C10Hresh.24antisens	5'-CAGTAATACACTGCAGTGTCCGCAGCGGTCAC	(SEQ ID No. 143)
7C10Hresh.25antisens	5'-AGTAGTCAAAGAAGACCCTACCGTATCTCGCA	(SEQ ID No. 144)
7C10Hresh.26antisens	5'-CTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCCCTGGCCCC	(SEQ ID No. 145)
7C10Hresh.BamHIantisens	5'-CGCAGAGGATCCACTCAC	(SEQ ID No. 146)

TABLE 10: Oligonucleotide pairing protocol for the *de novo* assembly of genes coding for the humanized forms of 7C10 VH and VL

de novo assembly of the MlUI–KpnI fragment of 7C10 VL humanized 1	*de novo* assembly of the KpnI–BamHI fragment of 7C10 VL humanized 1

Biotinylated oligo leader MluI 7C10 VL	Biotinylated oligo 7C10 L KpnI
Oligo pair 1 and 7	Oligo pair 13 and 20
Oligo pair 2 and 8	Oligo pair 14 and 21
Oligo pair 3 and 9	Oligo pair 15 and 22
Oligo pair 4 and 10	Oligo pair 16 and 23
Oligo pair 5 and 11	Oligo pair 17 and 24
Oligo pair 6 and 12	Oligo pair 18 and 25
Antisense oligo 7C10 VL KpnI	Oligo pair 19 and 26
	Antisense oligo 7C10 L BamHI
de novo assembly of the MluI–KpnI fragment of 7C10 VL humanized 1	*de novo* assembly of the KpnI–BamHI fragment of 7C10 VL humanized 1
Biotinylated oligo leader MluI 7C10 VH	Biotinylated oligo 7C10 H KpnI
Oligo pair 1 and 8	Oligo pair 15 and 21
Oligo pair 2 and 9	Oligo pair 16 and 22
Oligo pair 3 and 10	Oligo pair 17 and 23
Oligo pair 4 and 11	Oligo pair 18 and 24
Oligo pair 5 and 12	Oligo pair 19 and 25
Oligo pair 6 and 13	Oligo pair 20 and 26
Oligo pair 7 and 14	Antisense oligo 7C10 VH BamHI
Antisense oligo 7C10 VH KpnI	

Example 15: Construction of the genes coding for the humanized versions 2 of 7C10 VL and 7C10 VH and 3 of 7C10 VH by directed mutagenesis

The humanized version 2 of 7C10 VH was obtained by directed mutagenesis of

the residues 48 and 67 (according to Kabat's nomenclature) of version 1. This directed mutagenesis was carried out with the aid of the system QuikChange™ Site-directed mutagenesis of Stratagene (kit #200518) according to the protocol described by the manufacturer. The construction is carried out in two stages, first the residue 48 on version 1 was mutated with the aid of the pair of primers 7C10Hhumanized1QCM48 sense and antisense (see Table 11) and subsequently this version mutated at the residue 48 was itself mutated at the residue 67 with the aid of the pair of primers 7C10Hhumanized1QCI67 sense and antisense (see Table 11).

The humanized version 3 of 7C10 VH was obtained by site-directed mutation of the residues 30 and 71 (according to Kabat's nomenclature) of version 2 likewise using the system QuikChange™. This construction is carried out in two stages. At first, the residue 30 on version 2 was mutated with the aid of the primers 7C10HhumanizedQCT30 sense and antisense (see Table 11). Subsequently, this version mutated at the residue 30 was itself mutated at the residue 71 by using the pair of primers 7C10Hhumanized1V67QCR71 sense and antisense (see Table 11).

The humanized version 2 of 7C10 VL was obtained by site-directed mutation of the residue 2 (according to Kabat's nomenclature) of version 1 by using the system QuikChange™. The residue 2 on version 1 was mutated by using the pair of primers 7C10Lhumanized1QCV2 sense and antisense (see Table 11).

TABLE 11: List of the oligonucleotides used for the directed mutagenesis by the stratagene QuikChange™ system

7C10Hhumanisé1QCT30. sens	5'-CTGGTTACTCCATCAGCGGTGGTTATTTATG	(SEQ ID No. 147)
7C10Hhumanisé1QCT30. antisens	5'-CATAAATAACCACCGCTGATGGAGTAACCAG	(SEQ ID No. 148)
7C10Hhumanisé1QCM48. sens	5'-GGGACTGGAGTGGATCGGGTATATCAGCTAC	(SEQ ID No. 149)
7C10Hhumanisé1QCM48. antisens	5'-GTAGCTGATATACCCGATCCACTCCAGTCCC	(SEQ ID No. 150)
7C10Hhumanisé1QCI67. sens	5'-TCCCTCAAGGATCGAGTCACCATATCACGTG	(SEQ ID No. 151)
7C10Hhumanisé1QCI67. antisens	5'-CACGTGATATGGTGACTCGATCCTTGAGGGA	(SEQ ID No. 152)
7C10Hhumanisé1V67QCR71. sens	5' -GATCGAGTCACCATATCAGTGGACACGTCCAAGAA CCAG	(SEQ ID No. 153)
7C10Hhumanisé1V67QCR71. antisens	5' -CTGGTTCTTGGACGTGTCCACTGATATGGTGACTC GATC	(SEQ ID No. 154)
7C10Lhumanisé1QCV2. sens	5'-GCTTCCAGCAGTGATATTGTGATGACTCAGT	(SEQ ID No. 155)
7C10Lhumanisé1QCV2. antisens	5'-ACTGAGTCATCACAATATCACTGCTGGAAGC	(SEQ ID No. 156)

Example 16: Transfection of the cos7 cells by electroporation

The mammalian expression vectors containing the chimeric or humanized versions of the heavy and light chains of the antibody 7C10 were tested in cos7 cells for the transitory expression of the recombinant antibodies 7C10. The DNA was introduced into the cos cells by electroporation with the aid of a BioRad instrument (Gene Pulsar). The DNA (10 μg of each vector) is added to aliquots of 0.8 ml of cos cells at a concentration of 1 x 10^7 cells per ml in PBS buffer (without Ca++ and Mg++). A pulsation of 1900 volts and a capacity of 25 μF was delivered. The transfected cos cells are then added to 8 ml of DMEM medium containing 5% of calf serum and incubated at

37°C for 72 hours. The supernatant is then collected, centrifuged in order to eliminate the cell debris and tested by ELISA for the measurement of its concentration of recombinant antibody 7C10 of IgG1/human Kappa type.

Example 17: ELISA method for measuring the concentrations of recombinant antibody IgG1/human Kappa present in the supernatant of the cos transfectants

The supernatants produced by transitory expression in cos7 cells were tested for the presence of 7C10 antibody of IgG1/human Kappa type. For the detection of the IgG1/human Kappa immunoglobulin, 96-well ELISA plates (Maxisorb, Nunc) were coated with a goat anti-human IgG polyclonal antibody (specific for the gamma Fc fragment, Jackson Immuno-Research Laboratories Inc., #109-005-098). The supernatants of cos cells were diluted in series and added to the coated wells. After incubation for one hour at 37°C and washing, a goat anti-human light Kappa chain polyclonal antibody conjugated to peroxidase (HRP, Sigma, A-7164) was added. After incubation for 45 minutes at 37°C and washing, the TMB substrate (KPL #50-76-04) was added. After incubation for 10 minutes, the reaction was stopped by the addition of 1 M sulfuric acid and the optical density was read at 450 nm. A purified human IgG1/human Kappa immunoglobulin (Sigma, I-3889) of known concentration was used as a standard reference antibody.

Example 18: ELISA method for determining the recognition activity of 7C10 recombinant antibodies of human IgG1/Kappa type on the receptor for IGF1 (IGF-IR)

The cos7 culture supernatants were tested for their capacity to recognize IGF-IR by an ELISA method. 96-well ELISA plates (Dynex Immulon 2HB) were coated with 100 µl per well of a solution of PBS containing 0.31 ng/µl of IGF-IR (Human Insulin-Like Growth Factor I soluble Receptor, R & D Systems, #391-GR) by incubation for one night at 4°C. After washing with PBS containing 0.05% Tween 20, the plates were saturated by the addition of a solution of PBS containing 0.5% gelatin solution and incubation at 37°C for 1 hour. After three washes with PBS, the samples of cos supernatants to be tested, previously diluted in series in PBS containing 0.1% gelatin and 0.05% Tween 20, were added to the plates. After incubation at 37°C for 1 hour

followed by three washes (PBS containing 0.05% Tween 20), an anti-human IgG antibody (specific for the Fc fragment) conjugated to peroxidase (HRP, Jackson Immuno-Research Laboratories Inc., #109-035-098) was added (dilution to 1/5000 in PBS containing 0.1% gelatin and 0.05% Tween 20). After incubation for 45 minutes at 37°C and 3 washes (PBS containing 0.05% Tween 20), the TMB substrate (KPL #50-76-04) was added. After incubation for 10 minutes, the reaction was stopped by addition of 1 M sulfuric acid and the optical density was read at 450 nm.

Example 19: Determination of the recognition activity of IGF1-R by different versions of the humanized 7C10 antibody by "CDR grafting"

At first, we compared the recognition activity of humanized forms 1 of the heavy and light chains of 7C10 for the IGF-IR with respect to the chimeric form. Figure 28 shows the results of an ELISA test of recognition of the IGF-IR (see Example 18) from supernatants of the cos7 cells whose concentration of IgG1/human Kappa had been previously determined by ELISA (see Example 17). The titration curves of the four recombinant antibodies tested overlap perfectly indicating that their relative affinities for IGF-IR are very similar. It is therefore concluded from this that the humanized form 1 of 7C10, composed of the humanized light chain 1 (1 single mouse residue present in the framework regions) in combination with the humanized heavy chain 1 (4 mouse residues present in the framework regions), specifically recognizes the IGF-IR and has an affinity very similar to that of the chimeric antibody (mouse variable regions).

Subsequently, we looked at the influence of the residue 2 (according to Kabat's nomenclature) of the humanized light chain of 7C10 (humanized version 1 versus humanized 2, see figure 19) on the recognition of the IGF-IR. Figure 29 shows the results of the ELISA test for recognition of the IGF-IR (see Example 18) from supernatants of cos7 cells whose concentration of IgG1/human Kappa had been previously determined by ELISA (see Example 17). The two humanized versions 1 and 2 of the light chain had been combined successively with humanized 7C10 VH 1. The titration curves of the two combinations are superimposed indicating that the mutation of residue 2 of the light chain, which has been changed from one valine in the humanized version 1 to an isoleucine in the humanized form 2, apparently has no

influence on the relative affinity of recognition of the IGF1 receptor. The humanized form 2 of the light chain of 7C10 thus forms one version where no mouse residue (apart from CDRs) has been conserved. This version, totally humanized, represents the preferred version of 7C10 VL.

The totally humanized version of the 7C10 light chain (humanized version 2, see above) was tested in combination with the three humanized versions of the heavy chain of 7C10. Figure 30 shows the results of the ELISA test for recognition of the IGF-IR from supernatants of cos7 cells whose concentration of IgG1/human Kappa had been previously determined by ELISA (see Example 17). The titration curves are very similar and virtually overlap with the reference curve corresponding to the chimeric antibody, indicating that the three humanized versions 1, 2 and 3 of 7C10 VH give an identical relative affinity for IGF-IR when they are combined with humanized 7C10 VL 2. Other ELISA tests conducted in parallel (results not shown) have however revealed that a point mutation of the residue 71 (Kabat's nomenclature) from an arginine (mouse) to a valine (human) involved a small loss of affinity of the corresponding antibody for IGF-IR. It is thus reasonable to think that humanized 7C10 VH 2 has the same relative affinity for IGF-IR as humanized 7C10 VH 1. This humanized form 2 will therefore be preferred with respect to the form 1 since it only has two mouse amino acids (residues 30 and 71, see figure 24). The humanized form 3 which does not have any mouse residue (apart from CDRs) will also be preferred since it only seems to involve a minimal loss of affinity.

In conclusion, it appears that two humanized forms of the antibody 7C10 according to the present invention are particularly preferred. A form constituted by the combination of humanized 7C10 VH 2 (2 conserved mouse residues) with humanized 7C10 VL 2 (no conserved mouse residue) and another form constituted by the combination of humanized 7C10 VH 3 (no conserved mouse residue) with humanized 7C10 VL 2 (no conserved mouse residue). This last form constitutes the ultimate humanized version since no mouse residue is present at the same time in the heavy and light chains.

Example 20: Expression of EGFR and of IGF-IR on the surface of A549 cells

The synergy of action obtained by the coadministration of two MABs directed respectively against IGF-IR and EGFR was studied in nude mice carrying a non-small cell lung tumor established by subcutaneous injection (s.c.) of A549 cells (lung carcinoma cell line).

At first, and in order to ensure the presence of the two receptors IGF-IR and EGFR on the surface of the A549 cell before injecting this into the mouse, labeling for FACS reading of these cells was carried out with, respectively, the murine 7C10 anti-IGF-IR MAB (figure 37B) and the murine 225 anti-EGFR MAB (figure 37D). In order to do this, the cells were saturated for 30 min at 4°C with a solution of PBS 10% FCS (fetal calf serum), washed and then incubated for 30 min at 4°C with the MAB of interest. After 3 new washes, the secondary anti-species antibody coupled to FITC (fluorescein isothiocyanate) is added. After incubation for 30 min, reading on the FACS (Fluorescence Activated Cells Sorter) is carried out at 520 nm (excitation 488 nm).

The results presented in figures 37A to 37D show that the A549 cells have on their surface a comparable number of receptors for EGF and IGF1. In the two cases, the population is homogeneous with respect to the distribution of each of the receptors. The specificity of the labeling is confirmed by the use of an isotype control (figure 37C). These results validate the use of the A549 cell as a model for the study of a synergy of action on two IGF-IR and EGFR receptors and for the study of a collaboration of these two receptors.

Example 21: Synergy of action of an anti-IGF-IR MAB and of an anti-EGFR MAB coadministered *in vivo*, in the nude mouse in the context of an antitumor treatment

For this study, nude mice are grafted s.c. with 5.10^6 A549 cells. Five days after the cell graft, the tumors are measured and a homogeneous batch of mice in terms of tumor volume is formed. Starting from this batch, groups of 6 mice are generated at random. These mice will be treated intraperitoneally (i.p.), twice per week with each of the MAB 7C10 and 225 individually at the dose of 250 µg/mouse or with the two MAB in coadministration. The MAB 9G4 is administered as an experiment isotype control.

The results presented in figure 38 show that each of the antibodies 7C10 and 225 administered alone is capable of inducing a significant decrease in the tumor growth *in vivo*. It can be noted that the two MAB tested have a comparable activity on the growth of the tumor A549. In a surprising fashion with respect to the literature, a significant synergy is observed during simultaneous administration of the two MAB ($p < or = 0.01$ at each of the times of the kinetics in a t-test) suggesting that a collaboration of the two receptors exists for the optimum growth of a tumor *in vivo* and that, contrary to the data in the literature, the blockage of one of the two axes does not suffice to totally inhibit the growth mediated by the second.

Example 22: Study of the antitumor activity of the murine antibodies 7C10 and 225 coadministered in mice orthotopically implanted with A549 cells

The use of orthotopic models for the evaluation of the antitumor activity presents a particular interest with respect to the process of metastatic dissemination of a tumor. In order to evaluate the antitumor activity of an antibody mixture directed respectively against IGF-IR and EGFR, 10^6 A549 cells (non-small cell lung cancer) were implanted in the intrapleural cavity of nude mice. It is to be noted that the consequence of this type of tumor implantation is a metastatic dissemination similar to that observed in man and leads to the death of the animals. Figure 39 shows that the administration of the antibodies 225 and 7C10 alone allows a comparable and a significant gain in survival to be observed. In a surprising fashion, the coadministration of these two antibodies increases in a considerable fashion the survival of the animals suggesting that this treatment could have an impact on the metastatic dissemination of the tumor cells.

Example 23: 7C10 and 7H2HM inhibit the phosphorylation of the tyrosine of the β chain of IGF-IR and of IRS-I

MCF7 cells are cultured for 24 hours at 5.10^4 cells/cm^2 (75 cm^2 plates, COSTAR) in 20 ml of RPMI without phenol red, mixed with 5 mM of glutamine, penicillin/ streptomycin (respectively 100 U/100 µg/ml) and 10% of fetal calf serum. After three washes in PBS, the cells were incubated for 12 hours in medium (RPMI) without phenol red, devoid of fetal calf serum and mixed with 5 mM of glutamine,

penicillin/streptomycin, bovine serum albumin at 0.5 µg/ml (Sigma A-8022) and transferrin at 5 µg/ml (Sigma T8158).

For activation, the cells were first incubated at 37°C for 2 minutes with blocking antibodies (10 µg/ml) and then IGF1 (Sigma I3769, 50 ng/ml) was added for two additional minutes. The reaction was stopped by aspiration of the incubation medium and the plates were laid on ice. The cells were solubilized by addition of 0.5 ml of lysis buffer (50 mM tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate), mixed with protease inhibitors (1 tablet per 50 ml, Boehringer Ref.: 1697 498), and phosphatase inhibitors (Calbiochem Ref.: 524625 (1/100)). The cells were scraped off and the suspension was recovered and placed on a shaker at 4°C for 1.5 hours. The solutions were centrifuged at 12,000 rpm for ten minutes (4°C) and the protein concentrations of the supernatants were quantified by BCA.

500 µg of proteins of the cell lysate were mixed with the anti-IGF-IR (Santa cruz Ref.: sc-713) for immunoprecipitation and incubated on the shaker at 4°C for 1.5 hours. The immunoprecipitates were recovered by addition of protein A-agarose (Boehringer Ref.: 1 134 515) and incubated all night on the shaker at 4°C. For the immunoprecipitation of IRS-1, anti-IRS-1 antibodies coupled to agarose beads (Santa cruz Ref.: 559Ac) were used. The agarose beads were washed twice with 1 ml of lysis buffer, twice with a wash buffer 1 (50 mM tris-HCl pH 7.5; 500 mM NaCl; 0.1% Nonidet P40; 0.05% sodium deoxycholate (Boehringer 1 332 597), mixed with protease inhibitors and phosphatase inhibitors) and once with a wash buffer 2 (50 mM tris-HCl; 0.1% Nonidet P40; 0.05% sodium deoxycholate (Boehringer Ref.: 1 332 597), mixed with protease inhibitors and phosphatase inhibitors 1/100). The immunoprecipitates were resuspended in a Laemmli buffer, heated to 100°C for 5 minutes. The supernatants were analyzed by electrophoresis on polyacrylamide SDS gel (8% Novex EC6015). The proteins were transferred to a nitrocellulose membrane followed by either an immunoblot with anti-phosphotyrosine antibodies conjugated to HRP (upstate Biotechnology 4G10) or beta anti-chain of IGF-IR or anti-IRS-1 (Santa Cruz Ref.: sc 8038) followed by an anti-rabbit antibody conjugated to HRP. The imprints were revealed by chemiluminescence (Amersham RPN 2209) followed by autoradiography on Kodak X-mat AR films.

Figure 40A represents MCF7 cells nonstimulated (0) or stimulated either with IGF1 (50 ng/ml) alone (0+IGF-I) or combined with monoclonal or humanized anti-IGF-IR antibodies (10 μg/ml) 7C10, 1H7, 7H2HM. The antibodies 9G4 or hIgG1 are murine or human immunoglobulins of isotype IgG1 used as an experiment negative control. The beta chains of the IGF-IR were immunoprecipitated and blotted with phosphorylated anti-tyrosine antibodies. The results obtained show that the monoclonal or humanized anti-IGF-IR 7C10, 1H7 and 7H2HM antibodies inhibit the phosphorylation of the tyrosine of the beta chain of the IGF-IR.

Figure 40B represents MCF7 cells nonstimulated (0) or stimulated either with IGF1 (50 ng/ml) alone (0+IGF-I) or combined with monoclonal or humanized anti-IGF-IR antibodies (10 μg/ml) 7C10, 1H7, 7H2HM. As described above, the antibodies 9G4 or hIgG1 are murine or human immunoglobulins of isotype IgG1 used as an experiment negative control. The IRS-1 was immunoprecipitated and blotted with phosphorylated anti-tyrosine antibodies. The results obtained show that the monoclonal antibodies 7C10, 7H2HM and 1H7 inhibit the phosphorylation of the tyrosine of the IRS-1.

Example 24: 7C10 and 7H2HM induces the internalization of the IGF-IR

MCF7 and A549 cells were suspended to 1.10^7 cells/ml in PBS with 10% of fetal calf serum (FACS buffer). 1.10^6 cells were incubated for 30 minutes at 37°C with the monoclonal antibodies at 10 μg/ml (7C10, 7G3, 9G4) or at 20 μg/ml for 7H2HM. After washing, the cells were labeled at 4°C for 30 minutes with a biotinylated anti-IGF-IR (monoclonal antibody 12B1) and finally incubated at 4°C for 30 minutes with a conjugate of streptavidin-488 alexa Fluor®. The cells were analyzed by FACScan (Becton-Dickinson, Enembogegem, Belgium) with the Cellquest software after elimination of debris.

Figure 41 shows the A549 cells without coloration (1st peak), the A549 cells incubated with 7C10 or 7H2HM (2nd peak) and the A549 cells incubated with an irrelevant mouse or rat IgG1 (3rd peak). A decrease by two of the surface expression of the IGF-IR by the cells is seen when the cells have been previously incubated with 7C10 or 7H2HM.

Example 25: 7C10 and 7H2HM induce the degradation of the IGF-IR

MCF-7 cells were cultured for 24 hours at 10.10^4 cells/cm^2 (75 cm^2, Costar) in 15 ml of complete medium. Next, the cultures were washed three times with PBS and incubated for 12 hours with medium devoid of serum. Next, the cells were incubated with cycloheximide at 25 µg/ml alone or with 10 µg/ml of monoclonal antibody 7C10, 9G4, 7G3 or of IGF1 (50 ng/ml). In certain experiments, before incubation with the monoclonal antibodies, the cells were treated for 1 hour at 37°C with MG-132 (10 µM, Calbiochem 474791) in order to inhibit the proteasome activities. After incubation, the cells were washed and solubilized by addition of a lysis buffer. 20 µg of proteins were analyzed by electrophoresis on polyacrylamide gel at 8% of SDS and transferred to a nitrocellulose membrane followed by a beta anti-chain immunoblot of the IGF-IR such as described further above.

The analysis by Western-blot (figure 42A) of the integrity of the IGF-IR shows that 7C10 and 7H2HM induce the degradation of the receptor while the natural ligand does not cause any degradation of the latter. No degradation of the receptor is observed with the 9G4, an irrelevant antibody used as an isotype control. Figure 42B demonstrates, and with respect thereto, that the degradation is inhibited by a proteasome inhibitor MG132 (incubation period of 2 hours).

Comparable results were obtained with the humanized antibody 7H2HM (figure 42C).

Additional experiments using the murin 7C10 Mab have been performed and demonstrate that the degradation of IGF-IR is strongly proteasome dependant as the effect of 7C10 is totally abolished in presence of the proteasome inhibitor MG115 (Figure 57A). This property seems to be particular the our antibody as for other anti-IGF-IR described in the literature or in published patents the down-regulation does not occur via the proteasomal pathway (Sachdev et al., Cancer Res. 63:627-635, 2003; Burtrum et al. Cancer Res. 63, 8912-8921, 2003; patent US 2004/0202655 A1 (Pharmacia)). In addition to this degradation pathway, the 7C10 MAb seems to also induce the degradation of IGF-IR via the lysosomal/endosomal pathways as a substantial reduction of down regulation was observed when cells are treated with either methylamine or chloroquine (Figures 57 B and C).

After down-regulation the level of receptor remain significantly low at least for 31 hours (Figure 57D).

Example 26 : Evaluation of 7C10 and h7C10 ability to bind to IGF-IR and hybrid-R.

Example 26.1 : Evaluation of 7C10 and h7C10 ability to immunoprecipitate IGF-IR and hybrid-R purified from transfected cells respectively with IGF-IR and IR-A or IGF-IR and IR-B (thereafter referred as R+/IR-A or R+/IR-B

The goal of this study is to evaluate the ability of 7C10 and h7C10 to immunoprecipitate IGF-IR, IR or Hybrid-R.

7C10 and h7C10 are compared to 17-69 (which recognizes both IGF-IR well and Hybrid-R).

Method

The used cells for this study are listed thereafter:

- R+: R- fibroblasts stably transfected with the IGF-IR (IGF-IR) cDNA
- R-/IR-A: R- fibroblasts stably transfected with the insulin receptor isoform A (IR-A) cDNA
- R-/IR-B:R- fibroblasts stably transfected with the insulin receptor isoform B (IR-B) cDNA
- R+/IR-A: R- fibroblasts stably co-transfected with the IGF1 and the insulin receptor isoform A cDNA and, therefore, expressing hybrid receptors A (Hybrid-RsA)
- R+/IR-B: R- fibroblasts stably co-transfected with the IGF1 and the insulin receptor isoform B cDNA and, therefore, expressing hybrid receptors A (Hybrid-RsB)

For the obtention of cellular lysat, cells were solubilized in RIPA buffer and 4 mg protein used for immunoprecipitation.

Cell lysates were immuprecipitated as follows:

R+ with either 7C10 or h7C10

R+/IR-A and R+/IR-B with either 7C10 or h7C10 or 17-69

R-/IR-A and R-/IR-B with either MA-20 (an anti-IR antibody) or 7C10 or h7C10

Following immunoprecipitation, the pellet was resuspended in 2X sample buffer and subjected to SDS-PAGE (7.5 % polyacrylamide).

Filters were blotted as follows: Filters containing R+ lysates (and therefore only IGF-IR) with an anti-IGF-IR β-subunit (Santa Cruz). Filters containing lysates from all the remaining cells with an antibody anti-IR β-subunit (Santa Cruz).

Results

Two independent experiments are shown (Fig. 43A and Fig. 43B)

Comments

1) 7C10 and h7C10 are equally efficient in immunoprecipitating the IGF-IR (lanes 1 and 2)

2) Neither 7C10 nor h7C10 appreciably immunoprecipitate IR

3) Both 7C10 and h7C10 recognizes Hybrid-R.

Example 26-2: Displacement analysis of IGF1 on IGF-IR by 7C10, h7C10 and 1H7

IGF-IR from R+ cell lysates were immunocaptured in Maxisorb plates coated with 17-69 antibody.

^{125}I-IGF1 (Fig. 44) was then allowed to bind to immunocaptured receptors in the absence or the presence of increasing concentrations of unlabeled ligand (IGF1 or IGF2) or antibodies (7C10, h7C10, 1H7, 9G4). Results are plotted as percent of maximal specific binding.

Both 7C10 and h7C10 displace labeled IGF1 with a very similar efficiency with IC_{50} values less than 100 nM, and in this example with IC_{50} of about 1.3 nM and 1.9 nM respectively. By comparison, 1H7 was much less effective with an IC_{50} value up to 100 nM(Fig. 44).

Example 26-3: Displacement analysis of IGF1 on Hybrid-RsA by 7C10, h7C10 and 1H7

Hybrid-RsA from R+/IR-A cell lysates were immunocaptured in Maxisorb plates coated with anti IR antibody 83-7.

125I-IGF1 (Fig. 45) was then allowed to bind to immunocaptured receptors in the absence or the presence of increasing concentrations of unlabeled ligand (IGF1 or IGF2) or antibodies (7C10, h7C10, 1H7, 9G4). Results are plotted as percent of maximal specific binding.

Both 7C10 and h7C10 displace labeled IGF1 with a very similar efficiency with IC_{50} values less than 100 nM, and in this example of about 2.0 nM for each. By comparison, 1H7 was much less effective with an IC_{50} value up to 50 nM, preferably up to 100 nM (Fig. 45).

Example 26-4: Displacement analysis of IGF1 on Hybrid-RsB by 7C10, h7C10 and 1H7

Hybrid-RsB from R-/IR-B cell lysates were immunocaptured in Maxisorb plates coated with 83-7 antibody.

125I-IGF1 (Fig. 46) was then allowed to bind to immunocaptured receptors in the absence or the presence of increasing concentrations of IGF1 and IGF2 or antibodies (7C10, h7C10, 1H7, 9G4). Results are plotted as percent of maximal binding.

Both 7C10 and h7C10 displace labeled IGF1 with a very similar efficiency with IC50 values less tha 100 nM, and in this example of about 1.5 and 2.5 respectively. By comparison, 1H7 was much less effective with an IC50 value up to 100 nM (Fig. 46).

EXEMPLE 27: Internalization and degradation studies of the IGF-IR

Internalization and degradation studies were analyzed by FACS and western-blot amalysis. Internalization studies were performed by FACS analysis using a murine biotinylated anti-IGF-IR monoclonal antibody (Mab) thereafter described as 12B1 MAb and binding to an epitope different from the one recognized by 7C10 and h7C10 antibodies. The 7G3 MAb, a non neutralizing anti-IGF-IR was introduced as negative control. Both antibodies were generated in our laboratory. Confluent MCF-7 cells were trypsinized and $1x10^6$ cells from each cellular suspension was plated in 96-well plates in FACS buffer. Plates were incubated, either with or without 25 µg/ml of cycloheximide (Calbiochem), 30 min at 37°C with either IGF1 (50 ng/ml) or with 10 µg/ml of 7C10, 7G3, h7C10, mIgG1, hIgG1. Cells incubated with FACS buffer alone were used to determine the basal level of expression of the IGF-IR. Then cells were washed twice and 12 µg/ml of biotinylated-12B1 MAb were added to the plate. After 30 min of incubation at 4°C to avoid receptor internalization, cells were washed 3 times at 4°C and stained by addition of a streptavidin Alexa Fluor® 488conjugate (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Netherlands).

Both 7C10 and h7C10 cause a rapid down regulation of the IGF-IR with a maximum after 4 hours of incubation with the antibodies (Table 12). No down regulation was observed when cells were incubated either with IGF1, 7G3 non neutralizing Mab, murine (mIgG1) or human (hIgG1) isotype control. The absence of internalization when cells were incubated with IGF1 is probably due to the rapid recycling of IGF-IR ; indeed this rapid recycling phenomenon is well known by the man skill in the art for this type of receptor. These results were observed either in presence or in absence of cyclohexemide. Observed results are shown in the following Table 12.

Table 12

		Cells incubated without Cyclohexemide				Cells incubated with Cyclohexemide		
		Buffer	mIgG1 Biotinylé	12B1 Biotinylé		Buffer	mIgG1 Biotinylé	12B1 Biotinylé
5 min	Buffer	8	8	135		8	8	90
	IGF1	8	9	137		8	9	93
1 h	Buffer	9	9	153		8	8	89
	hIG1	8	9	150		8	9	92
	h7C10	9	9	64		8	8	37
	mIgG1	8	9	144		8	8	88
	7C10	9	9	61		8	9	36
	7G3	8	9	137		8	8	85
4 h	Buffer	8	8	136		8	8	95
	hIgG1	8	8	139		7	8	94
	h7C10	8	8	39		8	8	29
	mIgG1	9	9	130		8	8	78
	7C10	8	8	37		8	8	27
	7G	8	8	109		8	8	72
16 h	Buffer	8	9	135		8	9	85
	HIgG1	9	9	144		8	8	85
	H7C10	9	10	34		8	9	26
	MIgG1	9	10	100		10	10	56
	7C10	9	9	31		9	9	25
	7G3	9	9	90		9	9	57

Table 12 : Study of antibody induced IGF-IR internalization by FACS analysis

For immmunoblotting experiments 7.5 X 10^6 cells were plated in 75 cm^2 flasks in 15 ml of complete medium (red phenol-free RPMI and Ham-F12K respectively for MCF-7 and A549 both supplemented with 10% FCS and 1% L-Glutamine). Twenty

four hours after plating, cells were washed 3 times with PBS and incubated for 24 additional hours at 37°C. Then medium was removed and cells incubated either 1h, 4h or 16h at 37°C with 15 ml of serum-free medium with or without antibodies to be tested or with IGF-I. Cells were then harvested and lysed in Tris HCl buffer pH 7.5, 15% NaCl 1M (Sigma), 10% detergent mix (10 mM Tris-HCl, 10% Igepal) (Sigma), 5% sodium deoxycholate (Sigma), 1 protease inhibitor cocktail complete TM tablet (Roche) and 1% phosphatase inhibitor Cocktail Set II (Calbiochem). For Western blot analysis, equal amount of cell lysates were separated on 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose filters, probed with an anti-β IGF-IR rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotech), revelated with an anti rabbit IgG coupled to the HRP (Amersham Bioscience) and visualized by ECL (Amersham Bioscience).

Figures 47A and 47B represent the study of antibody induced degradation of the IGF-IR.

For immnuno-blotting analysis (Figures 47A and 47B), experiments were done without cyclohexemide as the above experiment shows that no difference was observed in presence or in absence of this compound. 7C10 and h7C10 cause a comparable internalization of the IGF-IR in both A549 (A) and MCF-7 (B) cells. In MCF-7 cells the maximal internalization was observed after four hours incubation with 7C10 and h7C10, whereas, for A549 the maximal internalization is observed as earlier as 1 hour. No degradation was observed when cells were incubated either with IGF-I, 7G3 or murine (mIgG1) or human (hIgG1) isotype control.

EXEMPLE 28: Study of the degradation pathway of IGF- IR

7.5 X 10^6 MCF-7 cells were plated in 75 cm^2 flasks in 15 ml of complete medium (red phenol-free RPMI supplemented with 10% FCS and 1% L-Glutamine). Twenty four hours after plating, cells were washed 3 times with PBS and incubated for 24 additional hours at 37°C in 15 ml serum-free medium . Then medium was removed and cells incubated for two hours in 7.5 ml of serum-free medium either containing 30µM MG115 or DMSO. Then, 7.5 ml of serum-free medium with or without h7C10, hIgG1 or IGF1 were added for 4 additionnal hours. Cells were then harvested and lysed in Tris HCl buffer pH 7.5, 15% NaCl 1M (Sigma), 10% detergent mix (10 mM Tris-HCl, 10% Igepal) (Sigma), 5% sodium deoxycholate (Sigma), 1 protease inhibitor

cocktail complete TM tablet (Roche) and 1% phosphatase inhibitor Cocktail Set II (Calbiochem). For Western blot analysis, equal amount of cell lysates were separated on 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose filters, probed with an anti-β IGF-IR rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotech), revelated with an anti rabbit IgG coupled to the HRP (Amersham Bioscience) and visualized by ECL (Amersham Bioscience). Figure 48 shows the obtained results.

To further characterize the pathway of degration of the h7C10 antibody, cells were incubated 4 hours with either IGF1 or human isotype control (hIgG1) in presence or in absence of the proteasome inhibitor MG115. In the herein described experiment h7C10 induced, a dramatic degradation of the IGF-IR either in presence or in absence of DMSO. No degradation was observed when IGF1 or hIgG1 were added. When cells were incubated with 30 μM MG115, no down regulation of the IGF-IR was observed demonstrating that the down regulation of IGF-IR on MCF-7 observed in Figure 2 occurs through the proteasome pathway. This property is surprising and of particular interest. Indeed none of the anti-IGF-IR antibody already described for inducing a degradation of the IGF-IR (Malauney EK and al, Cancer Research, 2003; Sachdev D and al, Cancer Research, 2003) involved the proteasome pathway for degradation.

Actually, it has been reported that IGF-IR is internalized and degraded via a lysosome-dependent pathway (Alessi et al., B. Curr. Biol., 1997). In addition, both Mab391 (Hailey et al., Molecular Cancer Therapeutics, 2002) and scFv-Fc (Sachdev et al., Cancer Research, 2003) down regulate IGF-IR by the endocytic pathway.

As a consequence, regarding the present knowledge, it can not be exclude that h7C10 also down regulate, in addition to the proteasome pathway as previously described, via other known and described pathways for anti-IGF-IR antibodies, i.e. lisosome-dependent and/or endocytic pathways.

Such a property, if validated, is of particular interest as it would demonstrate the capacity of the h7C10 to interact with different signalization/degradation pathways, and thus its therapeutic efficacy. Supplementary studies are in progress in order to validate this hypothesis.

Example 29: Anti-tumoral activity of the murine antibody 7C10 co-administrated with an anti-VEGF antibody on mice orthopically implanted with A549 cells

One million of A549 NSCLC were implanted through the chest wall into the left pleural cavity space of 6 weeks old Swiss nude mice following the protocol described by Klaus-Berthier et al. (Kraus-Berthier, L., Jan, M., Guilbaud, N., Naze, M., Pierre, A., and Atassi, G. Histology and sensitivity to anticancer drugs of two human non-small cell lung carcinomas implanted in the pleural cavity of nude mice. Clin. Cancer Res. 6(1):297-304, 2000). Seven days after the cell injection, mice were treated i.p. with a loading dose of 250 µg of antibodies, and them, twice a week with 125 µg of antibodies. For the combined therapy, antibodies were mixed prior to the injection.

The anti-VEGF antibody used was an IgG2b, clone 26503.11 commercialized by SIGMA. It was described as a neutralizing antibody (Ferrara N. et al., Biochem. Res. Com. 161:851, 1999; Ferrara et al., Endocrinol. Review, 13:18, 1992; Leung D.W. et al., Science 246:1306, 1989).

Figure 48 shows that a combined therapy increase dramatically the time survival compared to untreated mice or to mice treated with single therapy.

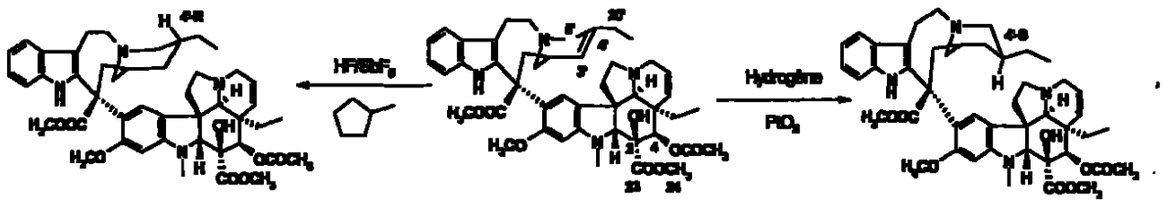
The T/C% are calculated according the following formula, [MEDIAN OF TREATED MICE / MEDIAN OF CONTROL MICE x 100]. The obtained T/C% are about 134% and 144% for the 7C10 and anti-VEF antibody respectively. For the combined treatment 7C10 + anti-VEGF antibodies, the T/C% is 188%.

As a conclusion, similarly to the co-administration of 7C10 + 225 (see example 22), the co-administration of 7C10 + anti-VEGF antibodies increase the mice survival.

Example 30: Production of deoxyvinblastine

4'-R deoxyvinblastine (structure see below Scheme 1) is obtained by ionic reduction of anhydrovinblastine according to a process known to those skilled in the art (Lafitte C et al., Tetrahedron Letters, 1998, Volume 39, pp. 8281-8282).

4'-S deoxyvinblastine, or 4'-S deoxyleurosidine, is obtained by catalytic hydrogenation of anhydrovinblastine according to the technique also known to those skilled in the art (De-Bruyn A. et al., Bulletin of the Belgian Chemical Society, 1983, Volume 92, number 5, pp 485-494).



Deoxyvinblastine Anhydrovinblastine Deoxyleurosidine

Scheme 1

Example 31 : Deacetylation of Vinca dimeric alkaloids

Deoxyvinblastine or deoxyleurosidine is dissolved and stirred for 4 hours at 50°C in 30 ml of methanol containing 1.2 equivalents of sodium methoxide. This solution is then poured into ice-cold water in order to precipitate the compound formed. After filtration, washing with water and drying under vacuum at 40°C, 4-deacetyldeoxyvinblastine or 4-deacetyldeoxyleurosidine is obtained, with a purity of greater than 95%.

Example 32: Direct coupling of 4'-deoxyvinblastine (4' R) or 4'-deoxyleurosidine (4' S) by reaction of a 4-carboxyhydrazide function on the pre-oxidized anti-IGF-IR antibodies

The 4'-deoxyvinblastine or the 4'-deoxyleurosidine is treated with anhydrous hydrazine in solution in methanol and at ambient temperature. The reaction is monitored by Analytical High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and, when 95% of the starting alkaloid has reacted, the reaction medium is treated with water in order for the 4'-deoxyvinblastine-3-deacetyl-4-carbohydrazide or the 4'-deoxyleurosidine-3-deacetyl-4-carbohydrazide to be separated by filtration.

After silica gel chromatography and then crystallization, the 4'-deoxyvinblastine-3-deacetyl-4-carbohydrazide or the 4'-deoxyleurosidine-3-deacetyl-4-carbohydrazide is greater than 96% pure.

The anti-IGF-IR antibody is oxidized under cold conditions in a sodium acetate buffer by treatment with sodium meta-periodate. After exclusion chromatography, the oxidized anti-IGF-IR antibody, in solution in an acetate buffer, is treated under cold conditions with the 4'-deoxyvinblastine-3-deacetyl-4-carbohydrazide or the 4'-deoxyleurosidine-3-deacetyl-4-carbohydrazide.

The immunoconjugate thus obtained is separated from the unconjugated residual Vinca alkaloid and purified by exclusion chromatography with a phosphate buffer at pH 7.4, and then intensive dialysis. The absence of free Vinca alkaloid is verified by analytical HPLC.

The immunoconjugate is characterized on an SDS PAGE-type electrophoresis gel (Coomassie blue and/or silver nitrate), by exclusion chromatography (SEC, UV at 280 nm) and by MALDI-TOF mass spectrometry. The mapping of the coupling sites is carried out by means of analysis by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC MS), subsequent to enzyme digestion (trypsin and PNGase F) (Laguzza et al., J. MED. CHEM., 1989, 32:548).

Example 33: Coupling of the 4'-deoxyvinblastine (4' R) or the 4'-deoxyleurosidine (4' S) to the anti-IGF-IR antibodies by virtue of succinic anhydride

The 3-deacetyl-4'-deoxyvinblastine or the 3-deacetyl-4'-deoxyleurosidine is treated with succinic anhydride in pyridine for 24 hours at 20°C. The reaction is monitored by analytical HPLC and, when 95% of the starting alkaloid has reacted, the reaction medium is treated with water in order to precipitate the 3-deacetyl-4'-deoxyvinblastine hemisuccinate or the 3-deacetyl-4'-deoxyleurosidine hemisuccinate. After filtration and drying, the compound is purified by reverse-phase preparative HPLC using C18 grafted silica and an eluent made up of acetonitrile, methanol and ammonium acetate buffer.

The 3-deacetyl-4'-deoxyvinblastine hemisuccinate or the 3-deacetyl-4'-deoxyleurosidine hemisuccinate is treated with hydroxybenzotriazole and dicyclohexylcarbodiimide in dimethylformamide at ambient temperature for 24 hours and in the presence of a catalytic amount of dimethylaminopyridine. After filtration, the solution is mixed with the anti-IGF-IR monoclonal antibody at pH 8.6 for 4 hours. The immunoconjugate is separated from the unconjugated Vinca alkaloid by exclusion chromatography with a phosphate buffer at pH 7.4. Intensive dialysis makes it possible to eliminate the unconjugated Vinca alkaloid. The immunoconjugate is characterized by SDS PAGE gel electrophoresis, by exclusion chromatography and by MALDI TOF mass spectrometry. The mapping of the coupling sites is carried out by means of liquid chromatography analysis coupled to mass spectrometry (LC MS), subsequent to enzyme

(trypsin) digestion, compared to a reference tryptic map obtained for the non-derived monoclonal antibody (Schneck et al., Clin. Pharmacol. Ther., 1990, 47:36; Rowland et al., Cancer. Immunol. Immunother., 1985, 19:1).

Example 34: Coupling of the 4'-deoxyvinblastine (4' R) or the 4'-deoxyleurosidine (4' S) on a nitrogen-containing residue of the anti-IGF-IR antibodies by virtue of a disulphide bridge included in the linkage

The 3-deacetyl-4'-deoxyvinblastine or the 3-deacetyl-4'-deoxyleurosidine is treated, in methylene chloride, at ambient temperature for 24 hours, in the presence of a catalytic amount of dimethylaminopyridine, with a large excess of 3-methyldisulphanylpropanoic acid and a large excess of dicyclohexylcarbodiimide. The reaction medium is treated conventionally and the 3-deacetyl-4'-deoxyvinblastine 3-methyldisulphanylpropanoate or the 3-deacetyl-4'-deoxyleurosidine 3-methyldisulphanylpropanoate is then purified by reverse-phase preparative HPLC using C18 grafted silica and an eluent made up of acetonitrile, methanol and ammonium acetate buffer.

The 3-deacetyl-4'-deoxyvinblastine 3-methyldisulphanylpropanoate or the 3-deacetyl-4'-deoxyleurosidine 3-methyldisulphanylpropanoate is treated with dithiothreitol in a mixture of water and methanol so as to obtain 3-deacetyl-4'-deoxyvinblastine 3-sulphanylpropanoate or 3-deacetyl-4'-deoxyleurosidine 3-sulphanylpropanoate, which is purified by reverse-phase preparative HPLC using C18 grafted silica and an eluent made up of acetonitrile, methanol and ammonium acetate buffer.

The anti-IGF-IR antibody is derivatized with N-succinimidyl 4-(2-pyridyldithio)propanoate (the trade name of which is SPDP) in a 50 mM potassium phosphate buffer, pH 6.5, containing 50 mM NaCl and 2 mM EDTA, for 90 minutes. Added to this solution of antibody thus derivatized is the 3-deacetyl-4'-deoxyvinblastine 3-sulphanylpropanoate or the 3-deacetyl-4'-deoxyleurosidine 3-sulphanylpropanoate dissolved in a minimum of DMSO. After contact for 24 hours, the immunoconjugate is isolated by exclusion chromatography and is characterized on an SDS PAGE electrophoresis gel, by exclusion chromatography and by MALDI TOF mass spectrometry (Ojima et al., J. Med. Chem., 2002, 45:5320).

Example 35: Coupling of the 4'-deoxyvinblastine (4' R) or the 4'-deoxyleurosidine (4' S) to the anti-IGF-IR antibodies by virtue of a terminal hydrazide function carried by a linkage connected to the Vinca alkaloid

The 3-deacetyl-4'-deoxyvinblastine or the 3-deacetyl-4'-deoxyleurosidine is treated, in methylene chloride at ambient temperature for 24 hours, in the presence of a catalytic amount of dimethylaminopyridine, with an excess of methyl monoester of 1,6-hexanedicarboxylic acid and an excess of dicyclohexylcarbodiimide. The reaction medium is treated conventionally and the 3-deacetyl-4'-deoxyvinblastine 3-methoxycarbonyl pentanoate or the 3-deacetyl-4'-deoxyleurosidine 3-methoxycarbonyl pentanoate is then purified by reverse-phase preparative HPLC using C18 grafted silica and an eluent made up of acetonitrile, methanol and ammonium acetate buffer.

The 3-deacetyl-4'-deoxyvinblastine 3-methoxycarbonyl pentanoate or the 3-deacetyl-4'-deoxyleurosidine 3-methoxycarbonyl pentanoate is treated by default with anhydrous hydrazine in solution in methanol at ambient temperature. The reaction is monitored by analytical HPLC and, when 70% of the starting alkaloid has reacted, the reaction medium is evaporated and the 3-deacetyl-4'-deoxyvinblastine 3-hydrazinocarbonyl pentanoate or the 3-deacetyl-4'-deoxyleurosidine 3-hydrazinocarbonyl pentanoate is purified by reverse-phase preparative HPLC using C18 grafted silica and an eluent made up of acetonitrile, methanol and ammonium acetate buffer.

The oxidation of the anti-IGF-IR antibody, the coupling with 3-deacetyl-4'-deoxyvinblastine 3-hydrazinocarbonyl pentanoate or 3-deacetyl-4'-deoxyleurosidine 3-hydrazinocarbonyl pentanoate, the purification and the identification are carried out according to the same techniques as those described in Example 32.

Example 36: Activity, compared in vivo, of the 7C10 and h7C10 antibodies on the A549 and MCF-7 models

In order to confirm the activity of the humanized antibody h7C10 in vivo, the latter was compared with 7C10 in the MCF-7 oestrogen-dependent breast tumor model and in the A549 non-small-cell lung tumor model.

To do this, 5.10^6 A549 cells were implanted subcutaneously in nude mice. Five days after this implantation, the tumors were measured and groups of 6 mice were

formed. These groups were treated, respectively, with 1) the 7C10 antibody injected ip (intraperitoneally) at a rate of 125 µg/dose twice a week; 2) the h7C10 antibody injected under the same conditions as its murine form; 3) PBS (it has been shown previously that murine and human control isotypes do not modify the tumor growth profile compared to treatment of the animals with PBS). In the MCF-7 breast tumor model, a sustained-release oestradiol granule (0.72 mg/tablet released over 60 days) is implanted subcutaneously 24 hours before implantation of the cells. This granule is essential to the establishment of any E2-dependent human tumor in this animal species.

Figures 50 and 51 show, as expected, that significant inhibition of tumor growth is observed with the 7C10 murine antibody. As regards the h7C10 humanized antibody, the activity observed is of exactly the same intensity as that observed with its murine counterpart, whatever the model used. This datum indicates that the humanization has not modified the properties of the antibody generated.

Example 37: Demonstration of the compared activities of vinblastine, of vincristine, of 4' S deoxyvinblastine and of 4' R deoxyleurosidine

The greater activity of the (4' R) deoxyvinblastine and of the (4' S) deoxyleurosidine was demonstrated in vivo against intravenously-grafted P388 murine leukaemia and compared with the activity of vinblastine and of vincristine tested under the same conditions. The protocol for this test is described by Kruczynski A. et al., Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 1998, volume 41, pages 437 to 447.

To do this, a total of 10^6 P388 murine leukaemia cells were implanted i.v. in CDF1 mice on day 0. After randomization of the animals in cages for treatment with each alkaloid and control cages, the compounds were administered i.p. on day 1.

Conventionally, the in vivo activity of compounds is expressed by the increase in survival time. The survival time is expressed by the T/C at a dose expressed in mg per kg (mg/kg). The T/C corresponds to the ratio, multiplied by 100, of the median of the survival time of the treated animals to the median of the survival time of the control animals. In agreement with the standard criteria of the NCI, a T/C of 120 corresponds to a minimum level for concluding that activity is present.

A T/C of between 120 and 175 makes it possible to conclude that there is significant activity and a T/C above 175 makes it possible to conclude that there is a high level of anti-leukaemia activity. A T/C below 75 expresses toxicity of the test compound at the dose administered.

Table 13 below gives the results obtained with a minimum of 7 and a maximum of 15 treated mice for each group of animals treated with a Vinca alkaloid or for the control group.

Table 13 gives the results of T/C values obtained for each Vinca alkaloid tested. Figures 52 and 53 show the greater anti-leukaemia activity of the 4'R and 4'S deoxyvinblastines compared to vinblastine and vincristine.

Table 13

Dose in mg/kg	0.63	1.25	2.5	5	10	20	40
T/C for vinblastine	114	114	129	143	57		
T/C for vincristine	114	143	143	100	57		
T/C for 4'-S-deoxyvinblastine	114	143	200	100	57		
T/C for 4'-R-deoxyvinblastine	100	100	129	143	200	214	43

Example 38: Demonstration of the in vivo antitumor activity of 4' R- and 4' S-deoxyvinblastine conjugated with IGR-IR antibodies on human tumors of various origins

In order to demonstrate the benefit of addressing the chemotherapy compounds (4' R) and (4' S) deoxyvinblastine (respectively called RDV and SDV in Figure 5) with a humanized antibody directed against IGF-IR, 5.10^6 A549 non-small-cell lung cancer cells were implanted in a subcutaneous position on the right flank of Swiss Nude mice. Seven days after implantation of the cells, the tumors can be measured and the animals are distributed randomly into 6 groups of 6 mice and treated according to the following protocol:

- h7C10: twice a week at a rate of 250 µg/dose throughout the entire duration of the experiment;

- RDV and SDV: 4 intraperitoneal injections 7 days apart at the dose of 0.35 mg/kg, which corresponds to the dose of each of the compounds present in the conjugates;
- the groups of animals given the chemotherapy compounds coupled to the antibody receive respectively 0.35 mg/kg of each of the chemotherapy agents and 250 µg/dose of antibodies. These conjugates are administered according to the same modes as the groups given the chemotherapy compounds alone;
- the animals of the control batch are given injections of PBS, administered according to the same frequency.

The weight of the mice and the tumor volume are evaluated twice a week. The tumor volumes are calculated according to the formula: ½ (length . width . height).

The results are shown in Figure 53.

The animals given only RDV or SDV evolve in the same manner as the control group, which seems coherent with respect to the optimum doses usually injected for these two compounds, which are respectively 20 mg/kg and 2.5 mg/kg. Surprisingly, when each of the compounds is coupled to the h7C10 antibody, a very significant inhibition of the tumor growth is observed. This inhibition is significantly greater than that observed with the antibody alone, administered at the same concentration.

All these results appear to indicate that targeting of the cells with the h7C10 antibody promotes concentration of the drug in the cell to be targeted and makes it possible to observe, as a result, significant inhibitions of tumor proliferation at low doses of chemotherapy product, and in particular at doses which are completely non-toxic in mice, as is demonstrated by the lack of weight loss of the animals (data not communicated).

EXEMPLE 39: In vivo down-regulation of IGF-IR

To confirm if previous *in vitro* observations (Examples 24 and 25) of down-regulation of IGF-IR levels by 7C10 and h7C10 was one of the mechanisms responsible for inhibition of tumor growth in vivo, the effect of h7C10 on IGF-IR levels in mice with MCF-7 xenograft tumors was tested. Nine mice bearing a xenograft tumor were studied. Tumors were resected from 3 mice before treatment (described as T0 in Figure 59). Then 3 mice received i.p. injections of 1 mg of A2CHM and 3 other mice received

i.p. injections of a hIgG1 used as isotype control. Six hours after treatment, mice were sacrificed and tumors harvested. Tumor samples were frozen in liquid nitrogen and homogeneized in a lysis buffer. A total of 50 µg of tumor extracts immunoblotted for total IGF-IRb levels. In this experiment, he cytokeratin 19 (CK19) was immunoblotted with an antibody recognizing specifically the CK19 from MCF-7 cells as control of the amount of tumor protein loaded in each lane. Figure 59 shows that the amount of protein loaded is comparable in all lanes excepted in lane 9 which could not be considered as interpretable. All MCF-7 xenograft tumors had high levels of IGF-IR in non treated mice (lanes 1-3). Six hours after treatment, tumor taken from animals treated with h7C10 had significant down regulation of IGF-IR (lanes 4-6). In two mice which received the isotype control no changes in the level of IGF-IR were observed within tumor tissue (lanes 7 and 8). These results confirm that the down-regulation of IGF-IR is one of the mechanisms involved in the in vivo activity of h7C10.

Example 40: Cell lines with IGF-IR overexpressed and/or abnormally overactivated:

The following cell lines are known as overexpressing and/or displaying overactivated IGF-IR :

- Prostate (PC3, DU145),
- breast (MCF-7, T47D, BT20, ZR-75-1, MDA-MB-231,
- lung (A549, A427, SK-LU-1)
- colon (HT29, Colo205, CaCo-2),
- thyroid (BC-PAP, FRO, ARO),
- ovarian (SK-OV-3),
- pancreas (BxPC3, MiaPaCa-2, LN36),
- renal, adrenal cancer, sarcomas (SK-ES-1), medulloblastoma (Daoy, TE-671, D283 Med),
- retinoblastoma, multiple myeloma (MM-1S, MM-1R), melanoma (SK-MEL-28)

The level of expression of some of the described cells above can be determined as follow :

To determine the level of expression of IGF-IR on various cell lines, cells were

labeled with 5 µg/ml of 7C10 antibody. 9G4 was used as irrelevant isotype control. Anti-mouse MAb coupled to FITC was used for revelation of the bound 7C10. In parallel, beads from DAKO QIFIKIT bearing quantified amounts of CD5 receptors were used for standard curve determination. After FACS analysis, beads yield a MFI. A standard curve relating MFI and receptor number was determined. MFI measured after cell staining with 7C10 was reported on the standard curve and receptor number on each tumor cell line was determined.

Quantification of the number of IGF-IR on tumor cell line surface shows that all the cell lines analyzed express between 1200 to 96000 receptors/cell.

Some preferred results are :

- IGF-IR	(MFI±sd)
- JURKAT	1201±833
- PC3	3903±1178
- CAKI 1	15887±nd
- T29	17102±2210
- A431	18530±2126
- LnCAP	19738±1080
- COLO205	23355±5711
- BxPC3	25185±3463
- A549	32179±5418
- CAKI 2	42673±693
- MCF-7	96072±2807

Example 41: Cell lines expressing hybrid-R:

The following cell lines are known as overexpressing and/or displaying overactivated hybrid-R and/or IGF-IR (Siddle et al.Horm. Res. 41: 56-65, 1994 ; Lynn Seely et al. Endocrinology. 136: 1635-1641, 1995 and Pandini et al. Clinical Cancer Res. 5 : 1935-1944. 1999) :

- Breast cancer (MDA-MB-231, MDA-MB-157, MDA-MB-468, MDA-MB-453, ZR-75),
- thyroid cancer (BC-PAP)

Example 42:

To determine the variation of IGF-IR between normal and tumor tissues, paraffin embedded section of either breast or lung cancer have been stained with a biotinylated-conjugated anti-IGF-IR monoclonal antibody. The result shown in figure 58 demonstrate that samples from patients with either lung or breast cancer display significantly higher levels of IGF-IR.

Example 43 : Tumoral Markers

Markers	Normal Values	Associated Cancers
ACE	< 5 ng/ml (for non smokers) < 10 ng/ml (for smokers)	Colorectal, pancreatic, stomach, breast, lung, thyroïde
aFP	< 15 ng/ml	liver, testis
ßHCG	< 0,1 ng/ml	testis, placenta (during pregnancy)
CA125	< 35 U/ml	ovarian
CA15.3	< 30 U/ml	breast
CA19.9	< 37 U/ml	pancreas, digestive system
CA 72.4	< 6 U/ml	stomach, ovarian
CYFRA 21.1	< 3,3 ng/ml	Non small cells lung cancer
5-HIAA urinary	5 to 45 mmol/24 h	carcinoïdes (digestive system)
NSE	< 12,5 ng/ml	Small cells lung cancer, central nervous system (neuroblastoma)
SCC	< 1,5 ng/ml	uterine, head and neck
Total PSA: free PSA:	< 4 ng/ml 10 à 40 % of total PSA	prostate
TG (thyroglobuline)	< 3 µg/l	Thyroid
CT (Calcitonine)	< 10 ng/l	Thyroid
LDH (lacticodeshydrogenase)	< 2 N	osteosarcoma

Table 14

The following non limitative references are incortporated by reference and are describing several preferred markers.

- PSA: Anaes, Service des recommendations professionnelles et service évaluation économique, September 2004;

- ACE: Fletcher 1986, Carcinoembryonic antigen. Ann. Intern. Med., 104(1):66-73; American Society, 1996, J. Clin. Oncol. 14(10):2843-77;
- CA19.9: Narimatsu et al., 1998, Cancer Res., 58(3):512-8 ; Vestergaard et al., 1999, Clin. Chem., 45(1): 54-61;
- CA15.3: Hayes et al., 1986, J. Clin. Oncol., 4(10):1542-50; Safi et al., 1989, Int. J. Biol. Markers, 4(4):207-14; Devine et al., 1995, Breast Cancer Res. Treat., 34(3):245-51; Yasasever et al., 1994, Eur. J. Gynaecol. Oncol., 15(1):33-6;
- TG: National Academy, 2001, [on-line], URL:http//www.nacb.org/thyroid_LPMG.htm; Piechaczyk et al., 1989, Clin. Chem., 35(3):422-4; Marquet et al., 1996, Clin. Chem., 42(2):258-62;
- CT: Motte et al., 1988, Clin. Chem. Acta, 174(1):35-54; Niccoli et al., 1997, J. Clin. Endocrinol. Metab., 82(2):338-41;
- LDH: Meyers et al., 1992, J. Clin. Oncol., 10(1):5-15;

Other genetic markers can be used as, for example (De Vita, Hellman & Rosemberg, "Cancer, Principles and Practice of Oncology", 6th edition, Edition Lippincott Williams & Wilkins, Chapter 26, page 653):

- Breast: Her2/NEU/ERBB2 amplification or BRCA1, BRCA2 mutation
- Prostate: PSA mRNA
- Bladder: TP53 mutation
- Colon: KRAS mutation
- Kidney: NF1, NF2 mutation.

CLAIMS

1. An isolated antibody, or one of its functional fragments, said antibody or one of its said fragments being characterized in that it is capable of binding to the hybrid-R, isoform(s) A and/or B, and inhibiting the binding of its native ligands, preferably designated herein as IGF1 and/or IGF2 and/or insulin, and/or capable of specifically inhibiting the tyrosine kinase activity of said hybrid-R,

said isolated antibody comprising a light chain comprising at least one complementary determining region CDR chosen from the CDRs of sequence SEQ ID Nos. 2, 4 and 6, and/or comprising a heavy chain comprising at least one CDR chosen from the CDRs of sequence SEQ ID Nos. 8, 10 and 12.

2. The antibody, or one of its functional fragments, as claimed in claim 1, characterized in that it is also capable of binding the IGF-IR and inhibiting the binding of its native ligands, preferably designated herein as IGF1 and/or IGF2, and/or capable of specifically inhibiting the tyrosine kinase activity of said IGF-IR.

3. The antibody, or one of its functional fragments, as claimed in claim 1 or 2, characterized in that it comprises a heavy chain comprising at least one CDR chosen from the CDRs of sequence SEQ ID Nos.8, 10 and 12.

4. The antibody, or one of its functional fragments, as claimed in one of claims 1 to 3, characterized in that it comprises a heavy chain comprising at least two of the three CDRs or the three CDRs of sequence SEQ ID Nos. 8, 10 and 12.

5. The antibody, or one of its functional fragments, as claimed in one of claims 1 to 4, characterized in that it comprises a light chain comprising at least one CDR chosen from the CDRs of sequence SEQ ID Nos. 2, 4 and 6.

6. The antibody, or one of its functional fragments, as claimed in one of claims 1 to 5, characterized in that it comprises a light chain comprising at least two of the three CDRs or the three CDRs of sequence SEQ ID Nos. 2, 4 and 6.

7. The antibody, or one of its functional fragments, as claimed in one of claims 1 to 6, characterized in that it does not bind in a significant manner to the human insulin receptor IR.

8. The antibody as claimed in one of claims 1 to 7, characterized in that said functional fragment is chosen from the fragments Fv, Fab, F(ab')2, Fab', scFv, scFv-Fc,

scFv-CH3 and the diabodies, or any fragment whose half-life would have been increased such as pegylated fragments.

9. A murine hybridoma capable of secreting an antibody as claimed in one of claims 1 to 8.

10. The murine hybridoma as claimed in claim 9 deposited at the CNCM, Institut Pasteur, Paris, on September 19, 2001 under the number I-2717.

11. An antibody, or one of its functional fragments, characterized in that said antibody is secreted by the hybridoma as claimed in claim 10.

12. The antibody, or one of its functional fragments, as claimed in one of claims 1 to 8, characterized in that said antibody comprises a light chain of sequence comprising the amino acid sequence SEQ ID No. 54, and/or in that it comprises a heavy chain of sequence comprising the amino acid sequence SEQ ID No. 69.

13. The antibody or one of its functional fragments, as claimed in claim 12, characterized in that said antibody is a chimeric antibody and moreover comprises the light chain and heavy chain constant regions derived from an antibody of a species heterologous to the mouse.

14. The chimeric antibody, or one of its functional fragments, as claimed in claim 13, characterized in that said heterologous species is man.

15. The chimeric antibody, or one of its functional fragments, as claimed in claim 14, characterized in that the light chain and heavy chain constant regions derived from a human antibody are respectively the kappa or lambda and gamma-1, gamma-2 or gamma-4 region.

16. The antibody or one of its functional fragments, as claimed in one of claims 1 to 8, characterized in that said antibody is a humanized antibody and comprises a light chain and/or a heavy chain in which the skeleton segments FR1 to FR4 of said light chain and/or heavy chain are respectively derived from skeleton segments FR1 to FR4 of human antibody light chain and/or heavy chain.

17. The humanized antibody, or one of its functional fragments, as claimed in claim 16, characterized in that said antibody comprises a light chain comprising the amino acid sequence SEQ ID No. 61 or 65, and/or in that it comprises a heavy chain comprising the amino acid sequence SEQ ID No. 75, 79 or 83.

18. The humanized antibody, or one of its functional fragments, as claimed in

claim 16 or 17, characterized in that said antibody comprises a light chain comprising the amino acid sequence SEQ ID No. 65, and/or in that it comprises a heavy chain of sequence comprising the amino acid sequence SEQ ID No. 79 or 83, preferably SEQ ID No. 83.

19. An isolated nucleic acid, characterized in that it is chosen from the following nucleic acids:

a) a nucleic acid, DNA or RNA, coding for an antibody, or one of its functional fragments, as claimed in one of claims 1 to 8 and 11 to 18;

b) a complementary nucleic acid of a nucleic acid such as defined in a); and

c) a nucleic acid of at least 18 nucleotides capable of hybridizing under conditions of great stringency with at least one of the CDRs of sequence SEQ ID No. 1, 3, 5, 7, 9 or 11.

20. A vector comprising a nucleic acid as claimed in claim 19.

21. A host cell comprising a vector as claimed in claim 20.

22. A transgenic animal with the exception of man comprising at least one cell transformed by a vector as claimed in claim 20.

23. A process for production of an antibody, or one of its functional fragments, as claimed in one of claims 1 to 8 and 11 to 18, characterized in that it comprises the following stages:

a) culture in a medium and appropriate culture conditions of a cell as claimed in claim 21; and

b) the recovery of said antibodies, or one of their functional fragments, thus produced starting from the culture medium or said cultured cells.

24. An antibody, or one of its functional fragments, capable of being obtained by a process as claimed in claim 23.

25. The antibody, or one of its functional fragments, as claimed in any one of claims 1 to 8, 11 to 18 and 24, characterized in that it is, moreover, capable of binding specifically to the human epidermal growth factor receptor (EGFR) and/or capable of specifically inhibiting the tyrosine kinase activity of said EGFR.

26. The antibody as claimed in claim 25, characterized in that it consists in a bispecific antibody and in that it comprises a second motif specifically inhibiting the binding of the EGF to the human epidermal growth factor receptor EGFR and/or

specifically inhibiting the tyrosine kinase activity of said EGFR.

27. The antibody as claimed in claim 26, characterized in that it is bivalent or tetravalent.

28. The antibody as claimed in one of claims 26 or 27, characterized in that said second motif is selected from the fragments Fv, Fab, F(ab')2, Fab', Fab'PEG, scFv, scFv-Fc, scFv-CH3 and the diabodies, or any form whose half-life would have been increased.

29. The antibody as claimed in any one of claims 26 to 28, characterized in that said second anti-EGFR motif is descended from the mouse monoclonal antibody 225, its mouse-man chimeric derivative C225, or a humanized antibody derived from this antibody 225.

30. The antibody, or one of its functional fragments, as claimed in one of claims 1 to 8, 11 to 18 and 24 to 29 as a medicament.

31. A composition comprising by way of active principle a compound consisting of or comprising or an antibody, or one of its functional fragments, as claimed in one of claims 1 to 8, 11 to 18 and 24 to 30.

32. The composition as claimed in claim 31, characterized in that it comprises a second compound chosen from the compounds capable of specifically inhibiting the binding of the EGF to the human epidermal growth factor receptor EGFR and/or capable of specifically inhibiting the tyrosine kinase activity of said EGFR.

33. The composition as claimed in claim 32, characterized in that said second compound is chosen from the isolated anti-EGFR antibodies, or their functional fragments, capable of inhibiting by competition the binding of the EGF to the EGFR.

34. The composition as claimed in claim 33, characterized in that said anti-EGFR antibody is chosen from the monoclonal, chimeric or humanized anti-EGFR antibodies, or their functional fragments.

35. The composition as claimed in either of claims 33 or 34, characterized in that said functional fragments of the anti-EGFR antibody are chosen from the fragments Fv, Fab, F(ab')2, Fab', scFv-Fc, scFv-CH3 and the diabodies, or any fragment whose half-life would have been increased, like pegylated fragments.

36. The composition as claimed in one of claims 33 to 35, characterized in that said anti-EGFR antibody is the mouse monoclonal antibody 225, its mouse-man

chimeric derivative C225, or a humanized antibody derived from this antibody 225.

37. The composition as claimed in any one of claims 31 to 36, characterized in that it comprises, moreover, as a combination product for simultaneous, separate or sequential use, a cytotoxic/cytostatic agent, an inhibitor of the tyrosine kinase activity of the receptors for IGF1 and/or for EGF, a corticosteroid agent, an anti-emetic agent, a cancer vaccine, an analgesic agent, an anti-vascular agent and/or an anti-proliferative agent.

38. The composition as claimed in claim 37, characterized in that said cytotoxic/cytostatic agent is chosen from the agents interacting with DNA, the anti-metabolites, the topoisomerase I or II inhibitors, or the spindle inhibitor or stabilizer agents or else any agent capable of being used in chemotherapy.

39. The composition as claimed in claim 37 or 38, characterized in that said cytotoxic/cytostatic agent is coupled chemically to at least one of the elements of said composition for simultaneous use.

40. The composition as claimed in claim 38 or 39, characterized in that said cytotoxic/cytostatic agent is chosen from the spindle inhibitor or stabilizer agents, preferably vinorelbine, vinflunine or vincristine.

41. The composition as claimed in one of claims 37 to 40, characterized in that said inhibitor of the tyrosine kinase activity of the receptors for IGF1 and/or for EGF is selected from the group consisting of derived natural agents, dianilino-phthalimides, pyrazolo- or pyrrolopyridopyrimidines or else quinazilines.

42. The composition as claimed in any one of claims 31 to 41, characterized in that it comprises, moreover, another antibody compound directed against the extracellular domain of the HER2/neu receptor, as a combination product for simultaneous, separate or sequential use intended for the prevention and for the treatment of cancer.

43. The composition as claimed in claim 42, characterized in that said antibody directed against the extramembrane domain of the HER2/neu receptor is Trastuzumab, or one of its functional fragments.

44. The composition as claimed in any one of claims 31 to 43, characterized in that one, at least, of said antibodies, or one of its functional fragments, is conjugated with a cell toxin and/or a radioelement.

45. The composition as claimed in one of claims 31 to 44 as a medicament.

46. The use of an antibody, or one of its functional fragments, as claimed in one of claims 1 to 8, 11 to 18 and 24 to 30 and/or of a composition as claimed in any one of claims 31 to 45 for the preparation of a medicament intended for the prevention or for the treatment of an illness connected with an overexpression and/or an abnormal activation of the hybrid-R and, optionally, EGFR, and/or connected with a hyperactivation of the transduction pathway of the signal mediated by the interaction of IGF1 or IGF2 or insulin with hybrid-R and, optionally, of EGF with EGFR.

47. The use of an antibody, or one of its functional fragments, as claimed in claim 2 and in one of claims 3 to 8, 11 to 18 and 24 to 30 when dependant to claim 2 and/or of a composition as claimed in any one of claims 31 to 45 when comprising an antibody dependant to claim 2, for the preparation of a medicament intended for the prevention or for the treatment of an illness connected with an overexpression and/or an abnormal activation of both the hybrid-R and the IGF-IR and, optionally, EGFR, and/or connected with a hyperactivation of the transduction pathway of the signal mediated by the interaction of IGF1 or IGF2 or insulin with hybrid-R and IGF1 or IGF2 with IGF-IR and, optionally, of EGF with EGFR.

48. The use as claimed in claim 46 or 47, characterized in that the administration of said medicament does not induce or only slightly induces secondary effects connected with inhibition of the insulin receptor IR.

49. The use as claimed in one of claims 46 to 48 for the preparation of a medicament intended to inhibit the transformation of normal cells into cells with tumoral character, preferably IGF-dependent, especially IGF1- and/or IGF2-dependent, and/or EGF-dependent and/or HER2/neu-dependent cells.

50. The use as claimed in any one of claims of 46 to 49 for the preparation of a medicament intended to inhibit the growth and/or the proliferation of tumor cells, preferably IGF-dependent, especially IGF1- and/or IGF2-dependent, and/or EGF-dependent and/or HER2/neu-dependent cells.

51. The use as claimed in one of claims of 46 to 50 for the preparation of a medicament intended for the prevention or for the treatment of cancer.

52. The use as claimed in claim 47 and 48 to 51 when dependant to claim 47, characterized in that said cancer is a cancer chosen from prostate cancer, osteosarcomas,

lung cancer, breast cancer, endometrial cancer, pancreatic cancer, myeloid cancer, bladder cancer, thyroid cancer, melanoma or colorectal cancer.

53. The use as claimed in claim 46 and claims 48 to 51 when dependant to claim 46, characterized in that said cancer is breast cancer or thyroid cancer.

54. The use as claimed in one of claims of 46 to 50 for the preparation of a medicament intended for the prevention or for the treatment of psoriasis.

55. A method of in vitro diagnosis of illnesses induced by an overexpression or an underexpression of the hybrid-R and, optionally, EGFR, starting from a biological sample in which the abnormal presence of hybrid-R and, optionally, EGFR, is suspected, characterized in that said biological sample is contacted with an antibody as claimed in one of claims 1 to 8, 11 to 18 and 24 to 30, it being possible for said antibody to be, if necessary, labeled.

56. A method of in vitro diagnosis of illnesses induced by an overexpression or an underexpression of both the hybrid-R and the IGF-IR and, optionally, EGFR, starting from a biological sample in which the abnormal presence of both hybrid-R and IGF-IR and, optionally, EGFR, is suspected, characterized in that said biological sample is contacted with an antibody as claimed in claim 2 and in one of claims 3 to 8, 11 to 18 and 24 to 30 when dependant to claim 2, it being possible for said antibody to be, if necessary, labeled.

57. A kit or set for carrying out a method of diagnosis of illnesses induced by an overexpression or an underexpression of the hybrid-R and, optionally, EGFR, or for carrying out a process for the detection and/or the quantification of an overexpression or of an underexpression of the hybrid-R and, optionally, EGFR, in a biological sample, preferably an overexpression of said receptor, characterized in that said kit or set comprises the following elements:

a) an antibody, or one of its functional fragments, as claimed in one of claims 1 to 8, 11 to 18 and 24 to 30;

b) optionally, the reagents for the formation of the medium favorable to the immunological reaction;

c) optionally, the reagents allowing the demonstration of hybrid-R/antibody and, optionally, EGFR/antibody complexes produced by the immunological reaction.

58. A kit or set for carrying out a method of diagnosis of illnesses induced by an

overexpression or an underexpression of both the hybrid-R and the IGF-IR and, optionally, EGFR, or for carrying out a process for the detection and/or the quantification of an overexpression or of an underexpression of both the hybrid-R and IGF-IR and, optionally, EGFR, in a biological sample, preferably an overexpression of said receptors, characterized in that said kit or set comprises the following elements:

a) an antibody, or one of its functional fragments, as claimed in claim 2 and in one of claims 3 to 8, 11 to 18 and 24 to 30 when dependant to claim 2;

b) optionally, the reagents for the formation of the medium favorable to the immunological reaction;

c) optionally, the reagents allowing the demonstration of hybrid-R/IGF-IR/antibody and, optionally, EGFR/antibody complexes produced by the immunological reaction.

59. The use of an antibody, or one of its functional fragments, as claimed in one of claims 1 to 8, 11 to 18 and 24 to 30, for the preparation of a medicament intended for the specific targeting of a biologically active compound to cells expressing or overexpressing the hybrid-R and, optionally, EGFR.

60. The use of an antibody, or one of its functional fragments, as claimed in claim 2 and in one of claims 3 to 8, 11 to 18 and 24 to 30 when dependant to claim 2, for the preparation of a medicament intended for the specific targeting of a biologically active compound to cells expressing or overexpressing the hybrid-R and IGF-IR and, optionally, EGFR.

61. A method of modulating hybrid-R activity in hybrid-R-responsive mammalian cells comprising: contacting the cells with an antibody as claimed in one of claims 1 to 8, 11 to 18 and 24 to 30.

62. A method of jointly modulating IGF-IR and hybrid-R activities in IGF-IR and hybrid-R-responsive mammalian cells comprising: contacting the cells with an antibody as claimed in claim 2 or in one of claims 3 to 8, 11 to 18 and 24 to 30 when dependant to claim 2.

63. The method of claim 61 or 62, wherein the antibody modulates hybrid-R activity in mammalian cells selected from the group consisting preferentially of breast cancer cells or thyroid cancer cells.

64. A method of decreasing hybrid-R activity in hybrid-R-responsive

mammalian cells comprising: contacting the cells with an antibody as claimed in one of claims 1 to 8, 11 to 18 and 24 to 30.

65. A method of jointly decreasing IGF-IR and hybrid-R activities in IGF-IR and hybrid-R-responsive mammalian cells comprising: contacting the cells with an antibody as claimed in claim 2 or in one of claims 3 to 8, 11 to 18 and 24 to 30 when dependant to claim 2, in an amount sufficient to decrease the activity of hybrid-R.

66. The method of claim 64 or 65, wherein the antibody decreases hybrid-R activity in mammalian cells selected from the group consisting of preferentially breast cancer cells or thyroid cancer cells.

67. A method of identifying a hybrid-R modulator comprising:

a) contacting hybrid-R with the antibody as claimed in one of claims 1 to 8, 11 to 18 and 24 to 30;

b) contacting the complex of (a) with a compound library;

c) identifying a compound which disrupts the complex of (a); and

d) determining whether the compound exhibits agonist or antagonist activity at the hybrid-R, wherein this activity indicates identification of a hybrid-R modulator.

68. A method of identifying an IGF-IR and hybrid-R modulator comprising:

a) contacting IGF-IR and hybrid-R with the antibody as claimed in claim 2 or in one of claims 3 to 8, 11 to 18 and 24 to 30 when dependant to claim 2;

b) contacting the complex of (a) with a compound library;

c) identifying a compound which disrupts the complex of (a); and

d) determining whether the compound exhibits agonist or antagonist activity at the IGF-IR and hybrid-R, wherein this activity indicates identification of an IGF-IR and hybrid-R modulator.

69. A method of identifying a hybrid-R modulator comprising:

a) screening a library of peptide sequences, wherein said library of peptide sequences bind to hybrid-R, and wherein the library is derived from a peptide sequence comprising at least one sequence selected from the group consisting of SEQ ID Nos. 2, 4, 6, 8, 10 and 12; and

b) determining whether the amino acid sequence isolated in (a) exhibits agonist or antagonist activity at hybrid-R-responsive cell selected from the group consisting of cell lines displaying hybrid-R, such as, for example, MDA-MB-231, MDA-MB-157,

MDA-MB-468, MDA-MB-453 and ZR-75 for breast cells and BC-PAP for thyroid cells, wherein this activity indicates identification of an hybrid-R modulator.

70. A method of identifying an IGF-IR and hybrid-R modulator comprising:

a) screening a library of peptide sequences, wherein said library of peptide sequences bind to IGF-IR and/or hybrid-R, and wherein the library is derived from a peptide sequence comprising at least one sequence selected from the group consisting of SEQ ID Nos. 2, 4, 6, 8, 10 and 12; and

b) determining whether the amino acid sequence isolated in (a) exhibits agonist or antagonist activity at IGF-IR and/or hybrid-R-responsive cell selected from the group consisting of cell lines displaying IGF-IR and/or hybrid-R, such as, for example, MCF-7, T47D, BT20, ZR-75-1, MDA-MB-231, MDA-MB-157, MDA-MB-468, MDA-MB-453 and ZR-75 for breast cells, PC3 and DU145 for prostate cells, A549, A427 and SK-LU-1 for lung cells, HT29, Colo205 and CaCo-2 for colon cells, BC-PAP, FRO and ARO for thyroid cells, SK-OV-3 for ovarian cells, BxPC3, MiaPaCa-2 and LN36 for pancreas cells, SK-ES-1 for renal adrenal cancer sarcoma cells, Daoy, TE-671 and D283 Med for medulloblastoma cells, MM-1S and MM-1R for retinoblastoma multiple myeloma cells and SK-MEL-28 for melanoma cells, wherein this activity indicates identification of an IGF-IR and hybrid-R modulator.

71. A method of determining regression, progression or onset of a pathological disorder characterized by increased expression and/or activation of human hybrid-R relative to normal comprising incubating a sample obtained from a patient with said disorder with a detectable probe that is specific for said human hybrid-R under conditions favoring formation of a probe/hybrid-R complex, the presence of which is indicative of the regression, progression or onset of said pathological disorder in said patient.

72. A method of determining regression, progression or onset of a pathological disorder characterized by increased expression and/or activation of both human IGF-IR and hybrid-R relative to normal comprising incubating a sample obtained from a patient with said disorder with a detectable probe that is specific for said human IGF-IR and hybrid-R under conditions favoring formation of a probe/hybrid-R and probe/IGF-IR complex, the presence of which is indicative of the regression, progression or onset of said pathological disorder in said patient.

73. The method of claims 71 and 72, wherein the probe is an antibody.

74. The method of claim 73, wherein said antibody is labelled with a radioactive label, a fluorescent label or an enzyme.

75. The method of claim 74 wherein said antibody comprises the antibody as claimed in claims 1 to 8, 11 to 18 and 24 to 30.

76. A method of detecting binding partners for the antibody of claim 1 in a sample, the method comprising:

a) incubating the antibody as claimed in one of claims 1 to 8, 11 to 18 and 24 to 30 with a biological sample obtained from a patient with a cell proliferative disorder characterized by abnormal level of expression and/or activation of human hybrid-R under conditions sufficient to allow specific binding of the antibody to its binding partner, and

b) detecting specific binding, wherein specific binding indicates the presence of a binding partner in the sample.

77. A method of detecting binding partners for the antibody of claim 2 in a sample, the method comprising:

a) incubating the antibody as claimed in claim 2 or in one of claims 3 to 8, 11 to 18 and 24 to 30 when dependant to claim 2 with a biological sample obtained from a patient with a cell proliferative disorder characterized by abnormal level of expression and/or activation of both human IGF-1R and hybrid-R under conditions sufficient to allow specific binding of the antibody to its binding partner, and

b) detecting specific binding, wherein specific binding indicates the presence of a binding partner in the sample.

78. A method of purifying a hybrid-R from a sample, the method comprising:

a) incubating the antibody as claimed in claims 1 to 8, 11 to 18 and 24 to 30 with a sample under conditions to allow specific binding of the antibody and the receptor; and

b) separating the antibody from the sample and obtaining the purified receptor.

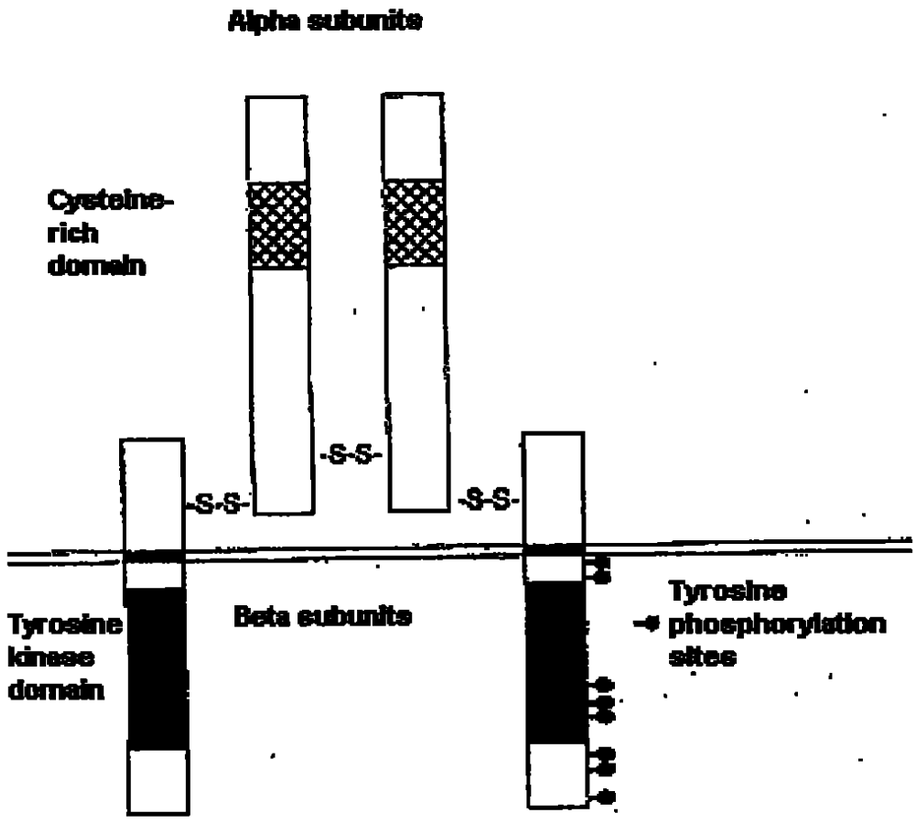

Alpha subunits
Cysteine-rich domain
-S-S-
-S-S-
-S-S-
Tyrosine kinase domain
Beta subunits
Tyrosine phosphorylation sites

FIGURE 1

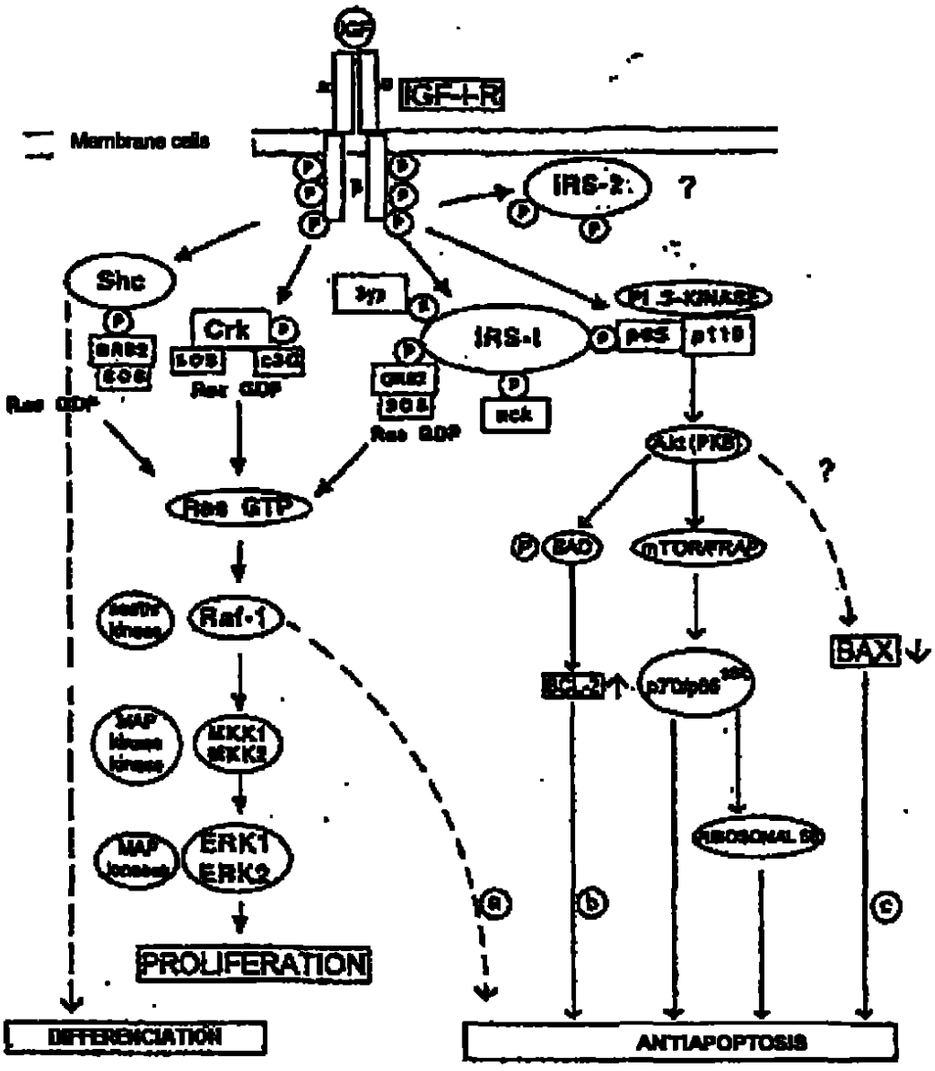

IGF
IGF-I-R
Membrane cells
IRS-2
?
Shc
Crk
3rp
IRS-1
PI 3-KINASE
p85
p110
nck
Ras GDP
Ras GTP
Akt (PKB)
BAD
mTOR/FRAP
Raf-1
BAX
ERK1
ERK2
PROLIFERATION
DIFFERENCIATION
ANTIAPOPTOSIS

FIGURE 2

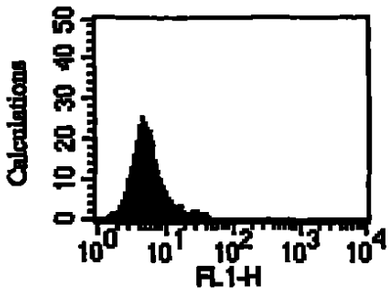


FIGURE 3A

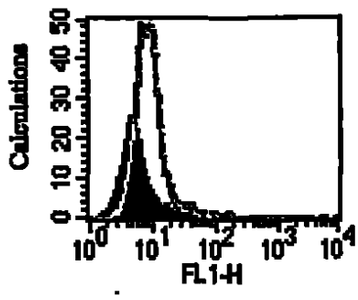


FIGURE 3B

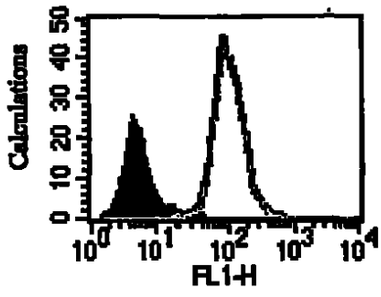
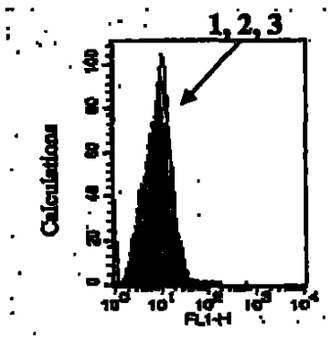
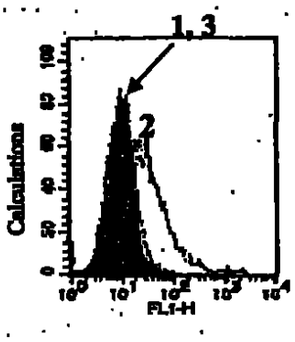


FIGURE 3C



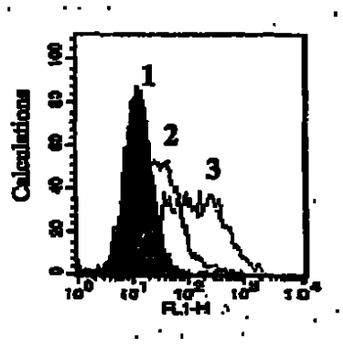
Nontransfected cells

FIGURE 4A



IGF-IR+ cells

FIGURE 4B



IR+ cells

FIGURE 4C

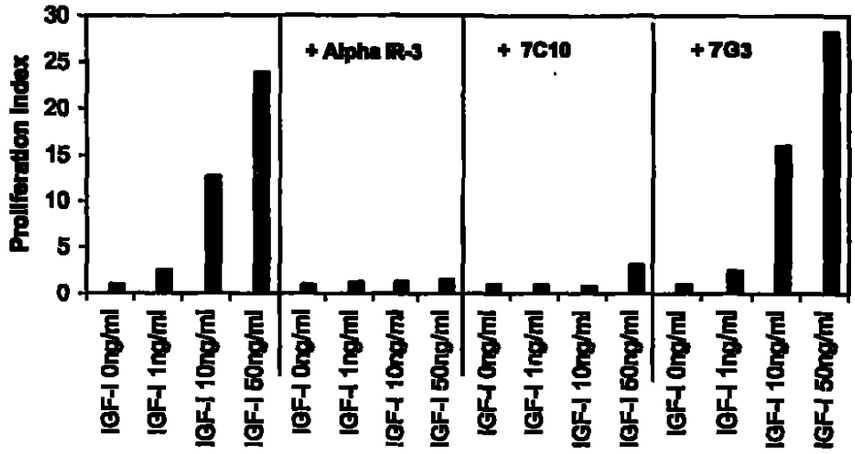


FIGURE 5

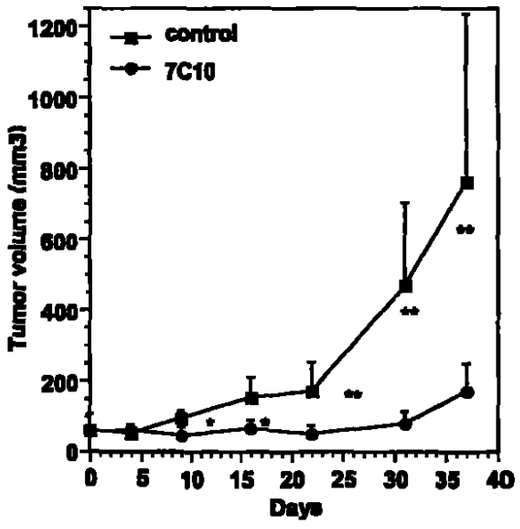


FIGURE 6A

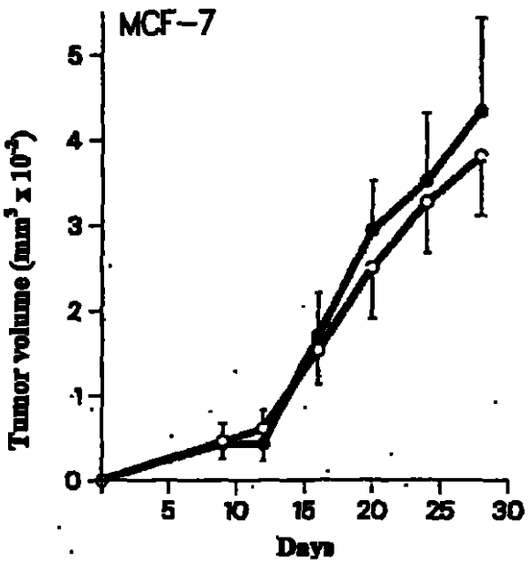


FIGURE 6B

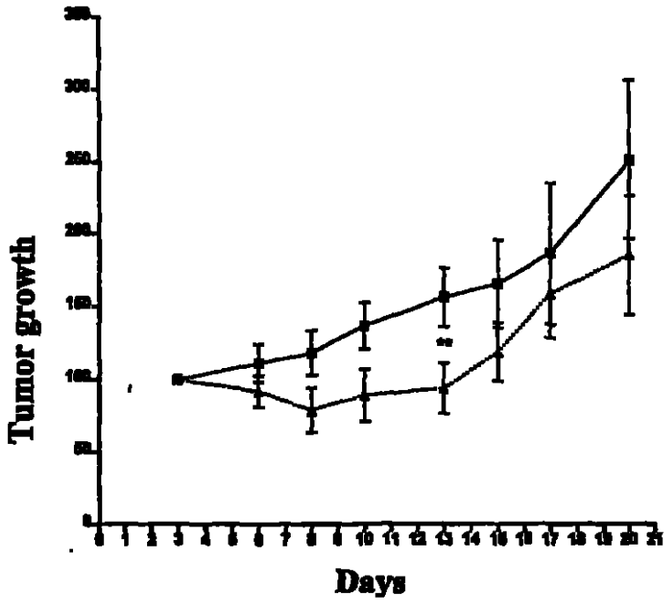


FIGURE 6C

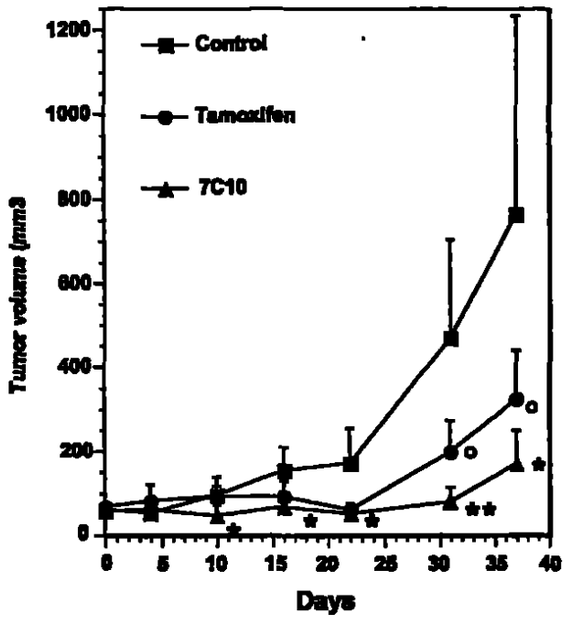


FIGURE 7

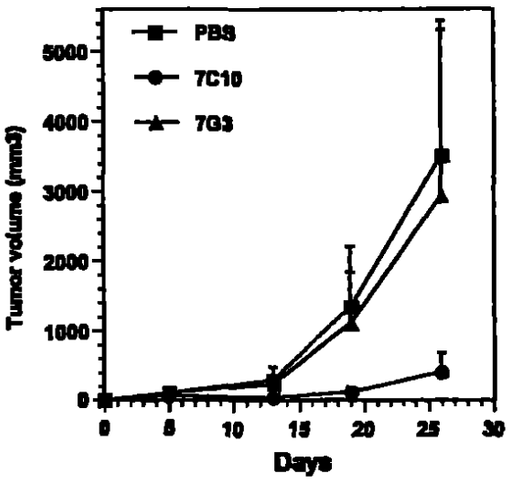


FIGURE 8A

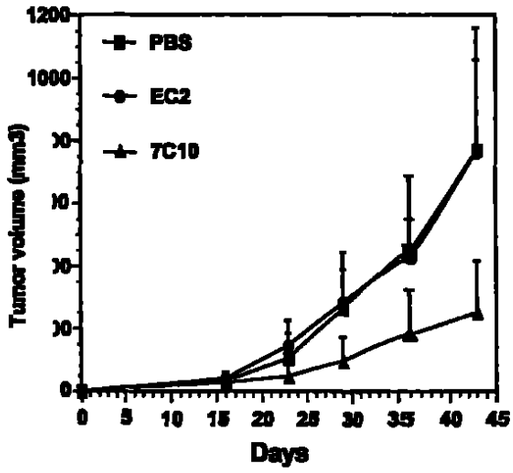


FIGURE 8B

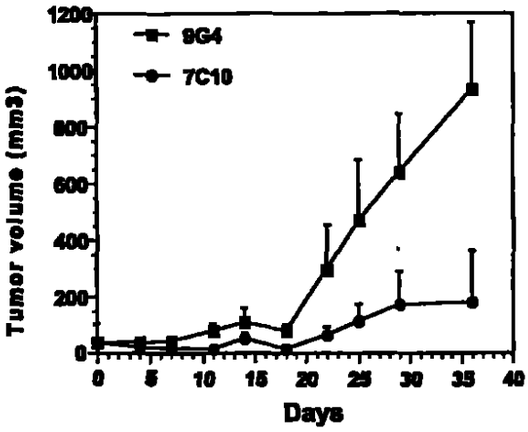


FIGURE 8C

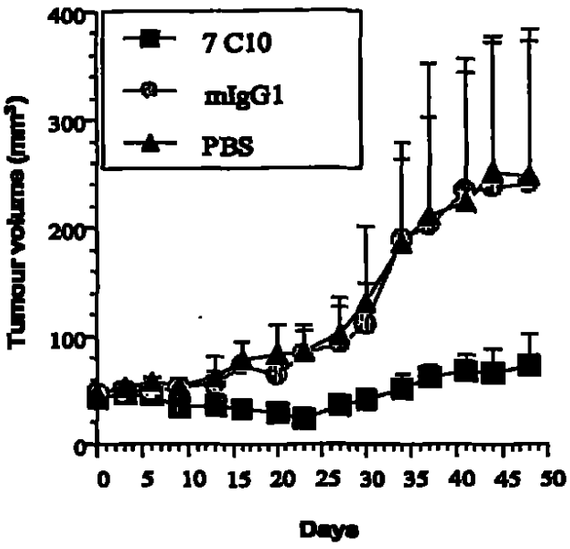


FIGURE 8D

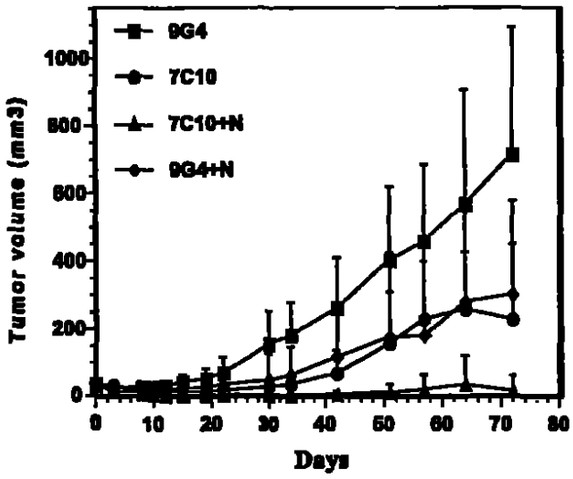


FIGURE 9

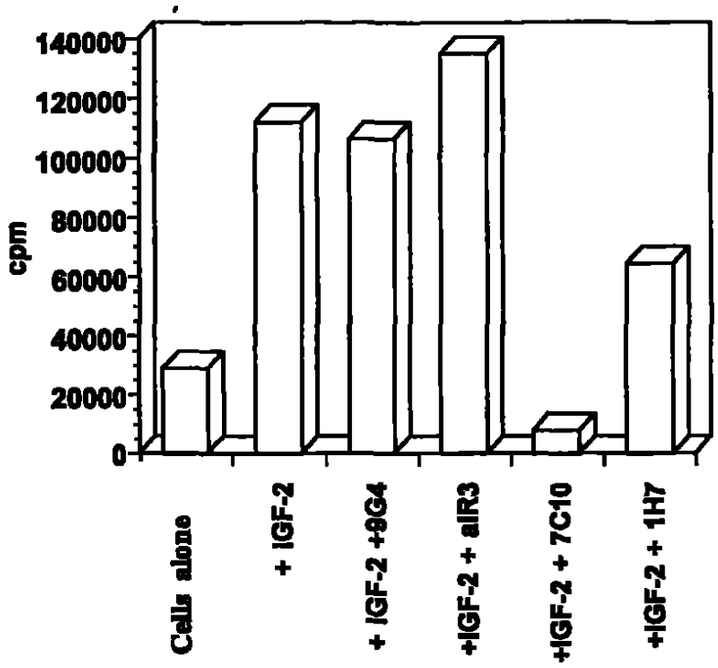


FIGURE 10

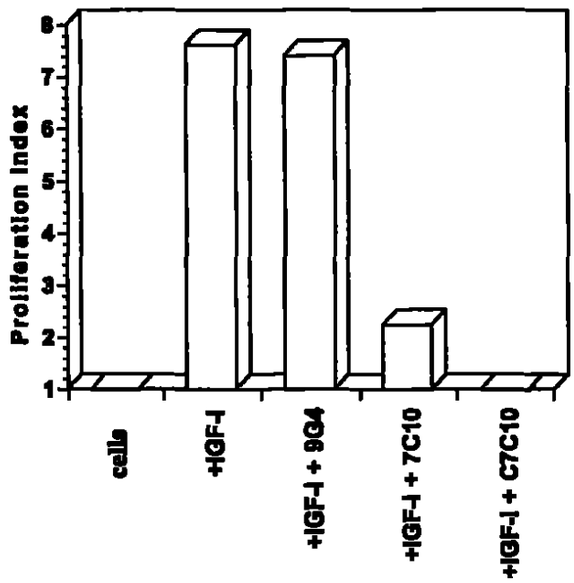


FIGURE 11

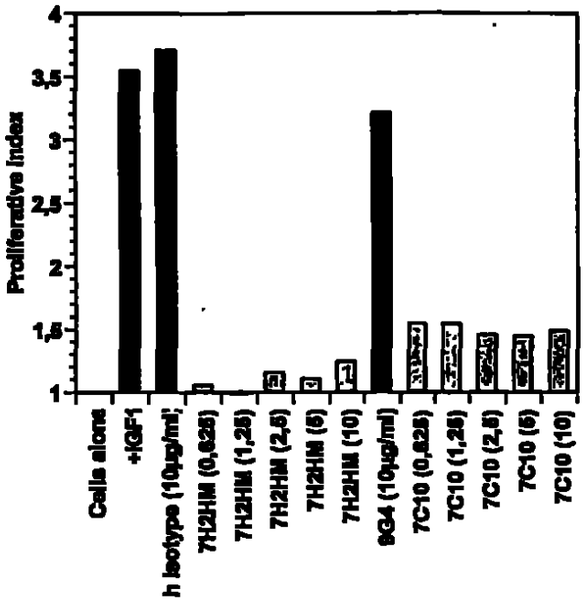


FIGURE 12



FIGURE 13

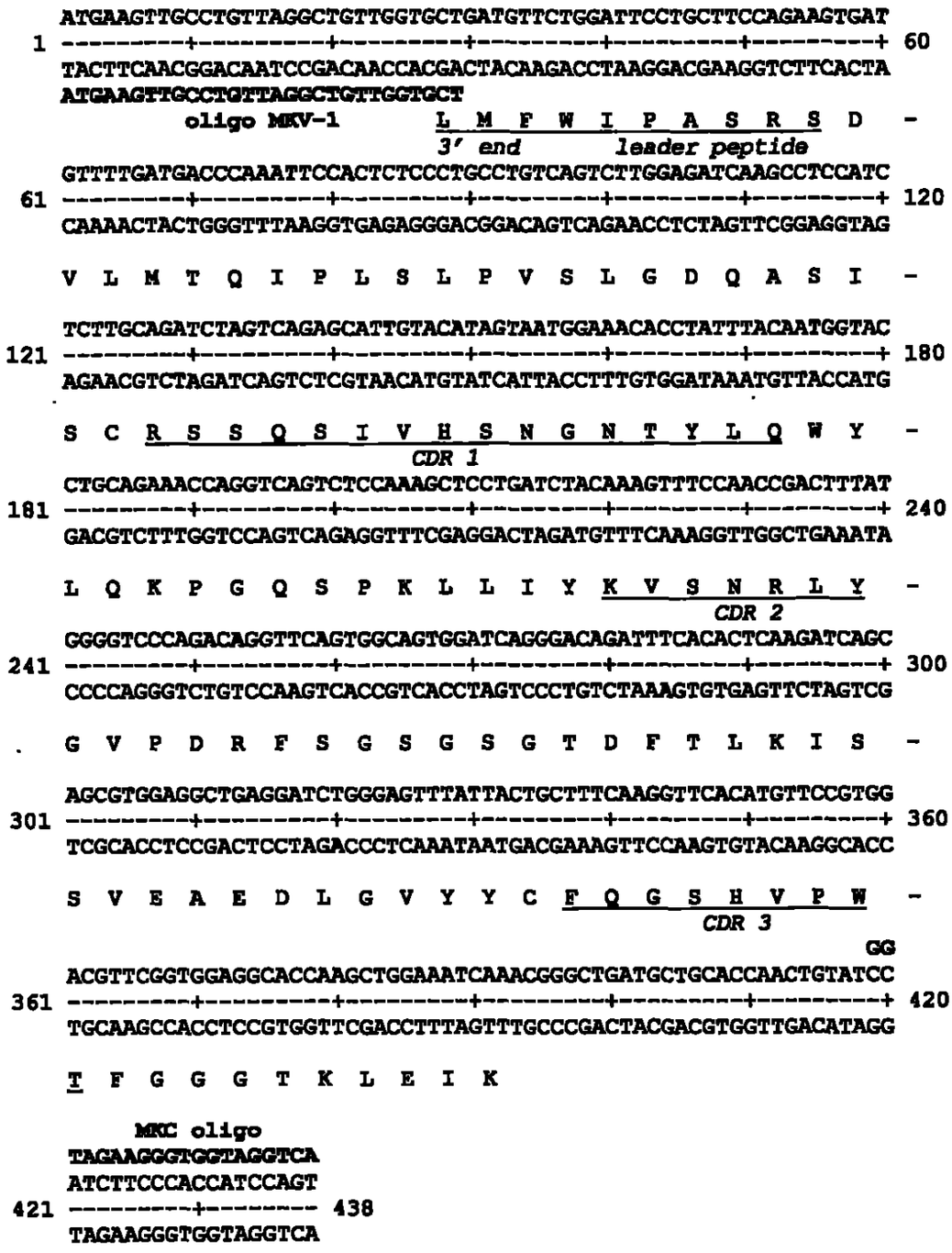

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCTGCTTCCAGAAGTGAT
1
60
TACTTCAACGGACAATCCGACAACCACGACTACAAGACCTAAGGACGAAGGTCTTCACTA
ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT
oligo MKV-1
L M F W I P A S R S D -
3' end
leader peptide
GTTTTGATGACCCAAATTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATC
61
120
CAAAACTACTGGGTTTAAGGTGAGAGGGACGGACAGTCAGAACCTCTAGTTCGGAGGTAG
V L M T Q I P L S L P V S L G D Q A S I -
TCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTACAATGGTAC
121
180
AGAACGTCTAGATCAGTCTCGTAACATGTATCATTACCTTTGTGGATAAATGTTACCATG
S C R S S Q S I V H S N G N T Y L Q W Y -
CDR 1
CTGCAGAAACCAGGTCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGACTTTAT
181
240
GACGTCTTTGGTCCAGTCAGAGGTTTCGAGGACTAGATGTTTCAAAGGTTGGCTGAAATA
L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R L Y -
CDR 2
GGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGC
241
300
CCCCAGGGTCTGTCCAAGTCACCGTCACCTAGTCCCTGTCTAAAGTGTGAGTTCTAGTCG
G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S -
AGCGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTCACATGTTCCGTGG
301
360
TCGCACCTCCGACTCCTAGACCCTCAAATAATGACGAAAGTTCCAAGTGTACAAGGCACC
S V E A E D L G V Y Y C F Q G S H V P W -
CDR 3
GG
ACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCC
361
420
TGCAAGCCACCTCCGTGGTTCGACCTTTAGTTTGCCCGACTACGACGTGGTTGACATAGG
T F G G G T K L E I K
MKC oligo
TAGAAGGGTGGTAGGTCA
ATCTTCCCACCATCCAGT
421
438
TAGAAGGGTGGTAGGTCA

FIGURE 14

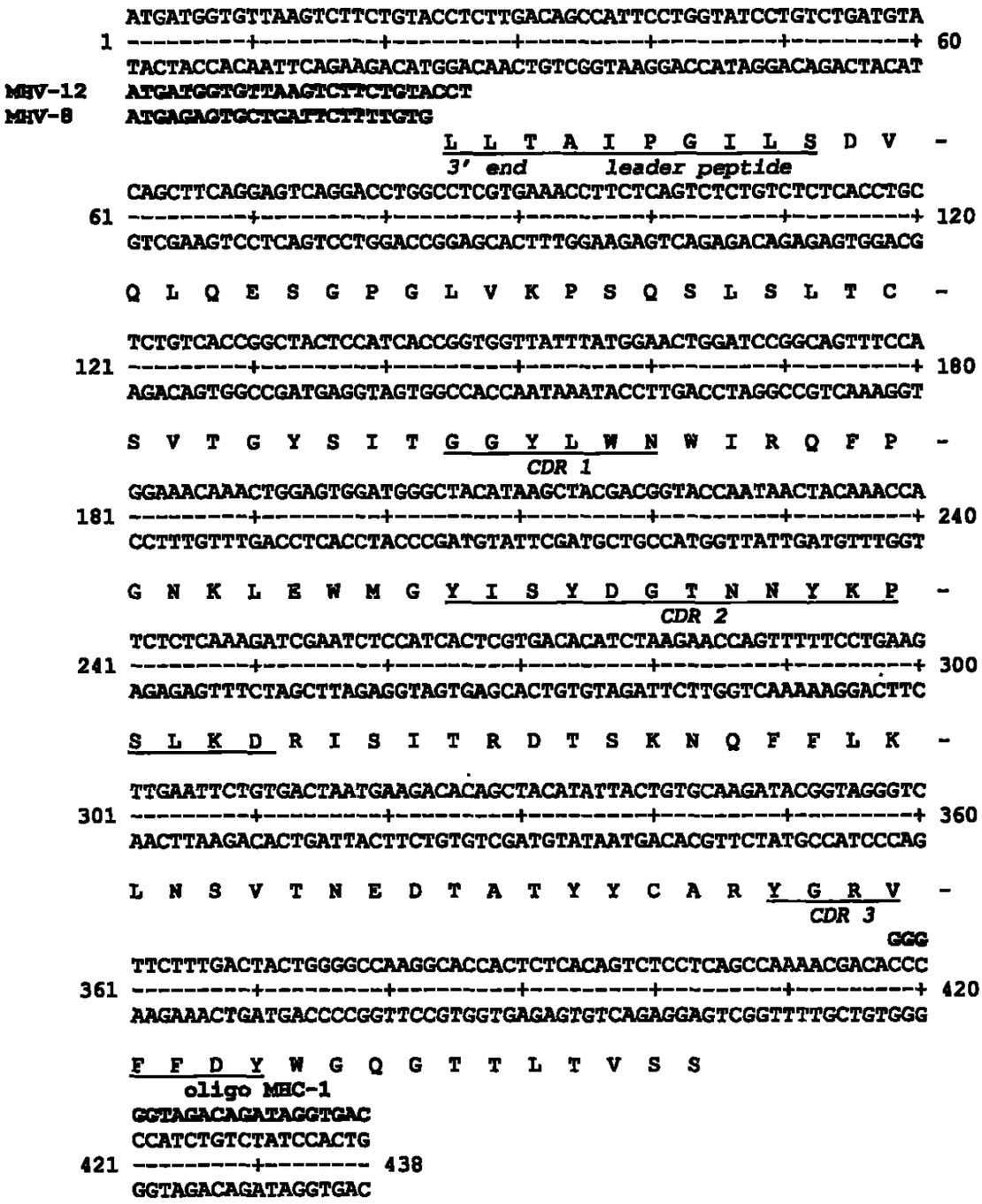

ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCTCTTGACAGCCATTCCTGGTATCCTGTCTGATGTA
1
60
TACTACCACAATTCAGAAGACATGGACAACTGTCGGTAAGGACCATAGGACAGACTACAT
MHV-12 ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCT
MHV-8 ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG
L L T A I P G I L S D V -
3' end
leader peptide
CAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTCGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCTCTCACCTGC
61
120
GTCGAAGTCCTCAGTCCTGGACCGGAGCACTTTGGAAGAGTCAGAGACAGAGAGTGGACG
Q L Q E S G P G L V K P S Q S L S L T C -
TCTGTCACCGGCTACTCCATCACCGGTGGTTATTTATGGAACTGGATCCGGCAGTTTCCA
121
180
AGACAGTGGCCGATGAGGTAGTGGCCACCAATAAATACCTTGACCTAGGCCGTCAAAGGT
S V T G Y S I T G G Y L W N W I R Q F P -
CDR 1
GGAAACAAACTGGAGTGGATGGGCTACATAAGCTACGACGGTACCAATAACTACAAACCA
181
240
CCTTTGTTTGACCTCACCTACCCGATGTATTCGATGCTGCCATGGTTATTGATGTTTGGT
G N K L E W M G Y I S Y D G T N N Y K P -
CDR 2
TCTCTCAAAGATCGAATCTCCATCACTCGTGACACATCTAAGAACCAGTTTTTCCTGAAG
241
300
AGAGAGTTTCTAGCTTAGAGGTAGTGAGCACTGTGTAGATTCTTGGTCAAAAAGGACTTC
S L K D R I S I T R D T S K N Q F F L K -
TTGAATTCTGTGACTAATGAAGACACAGCTACATATTACTGTGCAAGATACGGTAGGGTC
301
360
AACTTAAGACACTGATTACTTCTGTGTCGATGTATAATGACACGTTCTATGCCATCCCAG
L N S V T N E D T A T Y Y C A R Y G R V -
CDR 3
GGG
TTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCC
361
420
AAGAAACTGATGACCCCGGTTCCGTGGTGAGAGTGTCAGAGGAGTCGGTTTTGCTGTGGG
F F D Y W G Q G T T L T V S S
oligo MHC-1
GGTAGACAGATAGGTGAC
CCATCTGTCTATCCACTG
421
438
GGTAGACAGATAGGTGAC

FIGURE 15

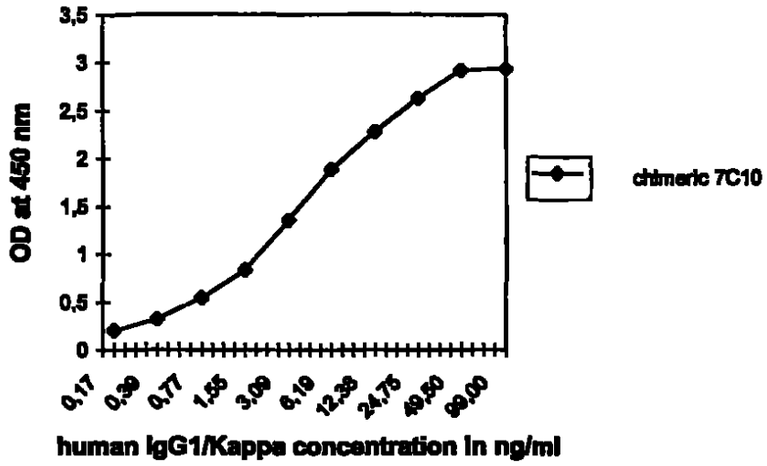


FIGURE 16

	3 7	CDR 1
7C10 VL mouse	DVLMTQIPLSLPVSLGDQASISC	***RSSQSIVHSNGNTYLQ***
DRB1-4.3	......T.....	.....***E***
C94-5B11'CL	......T.....	.....***E***
Kabat sgII mouse	..V...T.....	.....***L*****.....*****E***

	CDR 2	
7C10 VL mouse	WYLQKPGQSPKLLIY	***KVSNRLY*** GVPDRFSGSGSGTDFTL
DRB1-4.3	.....	.....***FS*** .....
C94-5B11'CL	.....	.....***FS*** .....
Kabat sgII mouse	.....	.....***FS*** .....

	77	CDR 3	
7C10 VL mouse	KISSVEAEDLGVYYC	***FQGSHVPWT***	FGGGTKLEIK
DRB1-4.3	...R.....	.....***F***.	..S....D..
C94-5B11'CL	...R.....	.....	.....
Kabat sgII mouse	...R.....	...***T***...***Y***.	.....

FIGURE 17

	CDR 1
7C10 VL mouse	DVLMTQIPLSLPVSLGDQASISC **RSSQSIVHSNGNTYLQ**
GM607	.IV...S.....TP.EP..... .....LL....YN..D
DPK15/A19	.IV...S.....TP.EP..... .....LL....YN..D
Kabat sgII hu	.IV...S.....TP.EP..... .....LL..D.XX..X

	CDR 2
7C10 VL mouse	WYLQKPGQSPKLLIY **KVSNRLY** GVPDRFSGSGSGTDFTLK
GM607	.....Q.... LG...AS .....
DPK15/A19	.....Q.... LG...AS .....
Kabat sgII hu	.....Q.... L....AS .....

	CDR 3
7C10 VL mouse	ISSVEAEDLGVYYC **FQGSHVPWT** FGGGTKLEIK
GM607	..R.....V..... M.ALQT.Q. ..Q...V...
DPK15/A19	..R.....V..... M.ALQT.
Kabat sgII hu	..R.....V..... M.ALQX.R. ..Q...V...

FIGURE 18

	CDR 1
7C10 VL mouse	DVLMTQIPLSLPVSLGDQASISC **RSSQSIVHSNGNTYLQ**
GM 607	.IV...S.....TP.EP..... .....LL....YN..D
7C10 VL Humanized 1	..V...S.....TP.EP..... .....
7C10 VL Humanized 2	.IV...S.....TP.EP..... .....

	CDR 2
7C10 VL mouse	WYLQKPGQSPKLLIY **KVSNRLY** GVPDRFSGSGSGTDFTL
GM 607	.....Q.... LG...AS .....
7C10 VL Humanized 1	.....Q.... ....
7C10 VL Humanized 2	.....Q.... ....

	CDR 3
7C10 VL mouse	KISSVEAEDLGVYYC **FQGSHVPWT** FGGGTKLEIK
GM 607	...R.....V..... M.ALQT.Q. ..Q...V...
7C10 VL Humanized 1	...R.....V..... ....Q...V...
7C10 VL Humanized 2	...R.....V..... ....Q...V...

FIGURE 19

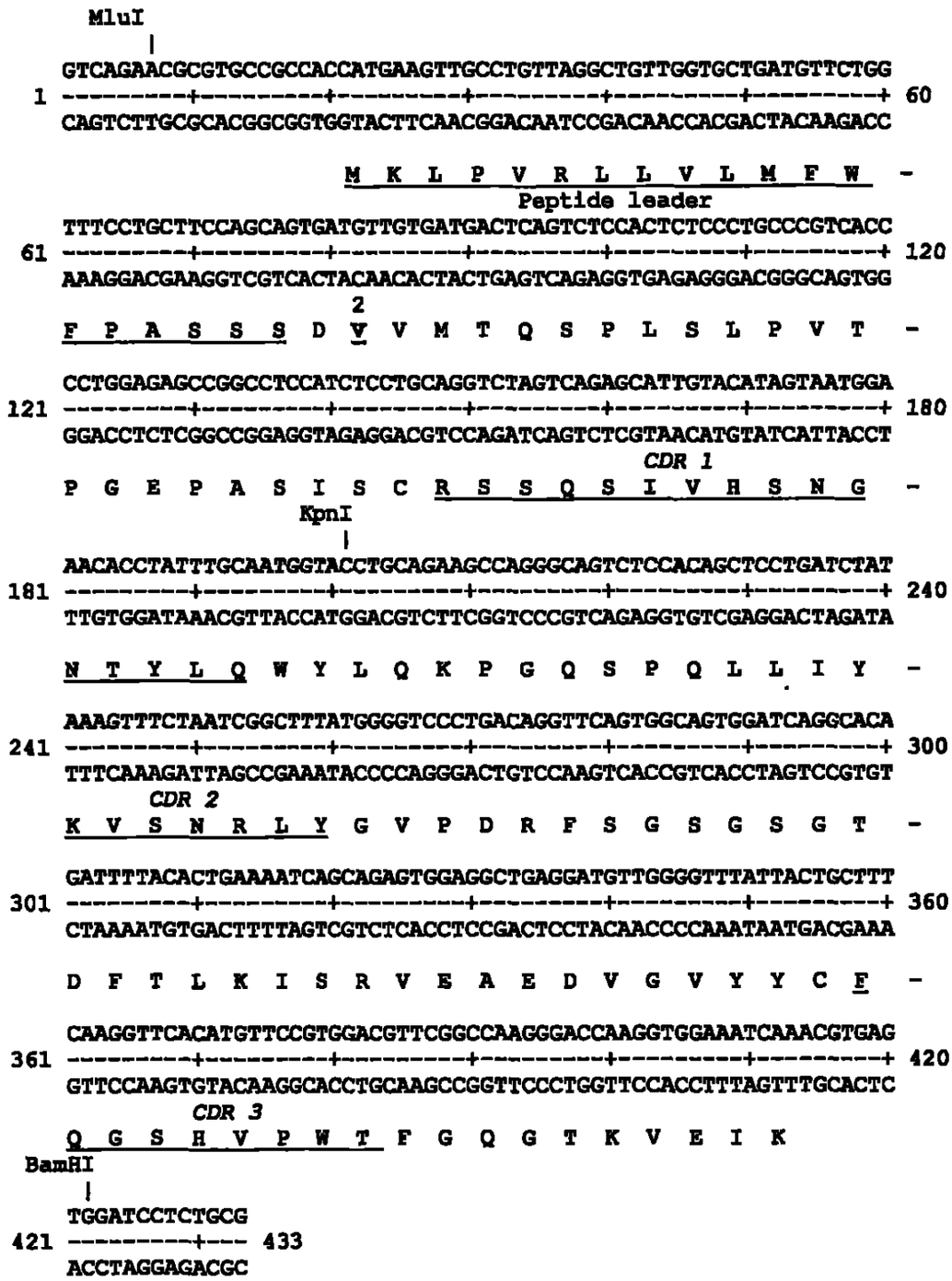

MluI
GTCAGAACGCGTGCCGCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGG
1
CAGTCTTGCGCACGGCGGTGGTACTTCAACGGACAATCCGACAACCACGACTACAAGACC 60
M K L P V R L L V L M F W -
Peptide leader
TTTCCTGCTTCCAGCAGTGATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACC
61
AAAGGACGAAGGTCGTCACTACAACACTACTGAGTCAGAGGTGAGAGGGACGGGCAGTGG 120
2
F P A S S S D V V M T Q S P L S L P V T -
CCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGA
121
GGACCTCTCGGCCGGAGGTAGAGGACGTCCAGATCAGTCTCGTAACATGTATCATTACCT 180
CDR 1
P G E P A S I S C R S S Q S I V H S N G -
KpnI
AACACCTATTTGCAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTAT
181
TTGTGGATAAACGTTACCATGGACGTCTTCGGTCCCGTCAGAGGTGTCGAGGACTAGATA 240
N T Y L Q W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y -
AAAGTTTCTAATCGGCTTTATGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACA
241
TTTCAAAGATTAGCCGAAATACCCCAGGGACTGTCCAAGTCACCGTCACCTAGTCCGTGT 300
CDR 2
K V S N R L Y G V P D R F S G S G S G T -
GATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCTTT
301
CTAAAATGTGACTTTTAGTCGTCTCACCTCCGACTCCTACAACCCCAAATAATGACGAAA 360
D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F -
CAAGGTTCACATGTTCCGTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTGAG
361
GTTCCAAGTGTACAAGGCACCTGCAAGCCGGTTCCCTGGTTCCACCTTTAGTTTGCACTC 420
CDR 3
Q G S H V P W T F G Q G T K V E I K
BamHI
TGGATCCTCTGCG
421
ACCTAGGAGACGC 433

FIGURE 20

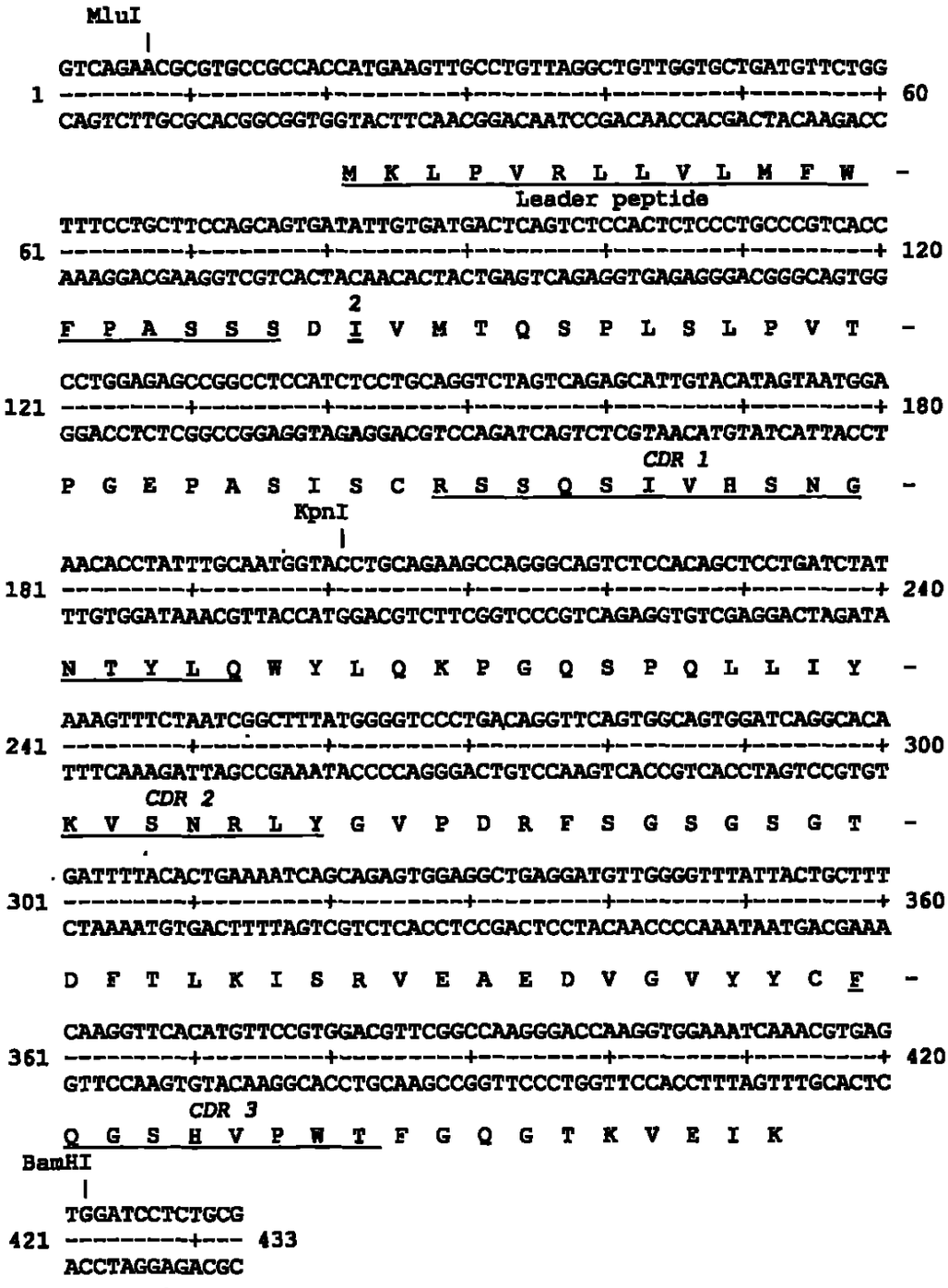

MluI
GTCAGAACGCGTGCCGCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGG
CAGTCTTGCGCACGGCGGTGGTACTTCAACGGACAATCCGACAACCACGACTACAAGACC
M K L P V R L L V L M F W -
Leader peptide
TTTCCTGCTTCCAGCAGTGATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACC
AAAGGACGAAGGTCGTCACTACAACACTACTGAGTCAGAGGTGAGAGGGACGGGCAGTGG
2
F P A S S S D I V M T Q S P L S L P V T -
CCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGA
GGACCTCTCGGCCGGAGGTAGAGGACGTCCAGATCAGTCTCGTAACATGTATCATTACCT
CDR 1
P G E P A S I S C R S S Q S I V H S N G -
KpnI
AACACCTATTTGCAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTAT
TTGTGGATAAACGTTACCATGGACGTCTTCGGTCCCGTCAGAGGTGTCGAGGACTAGATA
N T Y L Q W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y -
AAAGTTTCTAATCGGCTTTATGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACA
TTTCAAAGATTAGCCGAAATACCCCAGGGACTGTCCAAGTCACCGTCACCTAGTCCGTGT
CDR 2
K V S N R L Y G V P D R F S G S G S G T -
GATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCTTT
CTAAAATGTGACTTTTAGTCGTCTCACCTCCGACTCCTACAACCCCAAATAATGACGAAA
D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F -
CAAGGTTCACATGTTCCGTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTGAG
GTTCCAAGTGTACAAGGCACCTGCAAGCCGGTTCCCTGGTTCCACCTTTAGTTTGCACTC
CDR 3
Q G S H V P W T F G Q G T K V E I K
BamHI
TGGATCCTCTGCG
ACCTAGGAGACGC
433

FIGURE 21

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

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

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

FIGURE 22

```
                          Rch 1                30  CDR 1 Rch 2
7C10 VH mouse     DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSIT GGYLWN WIRQ
human Kabat sgII  Q..............T.....T.S.G.VS SYWS.. ....
human VH FUR1'CL  Q..............ET.....T.S....S S..Y.S ....
human Germline    Q..............ET.....T.S....S S..Y.S ....

                  Rch 2  48       CDR 2       67  71  Rch 3
7C10 VH mouse     FPGNKLEWMG YISYDGTNNYKPSLKD RISITRDTSKNQFFL
human Kabat sgII  P..KG...I. R.Y.S.STX.N....S .VT.SV.......S.
human VH FUR1'CL  P..KG...I. SMFHS.SSY.N....S .VT.SV.......S.
human Germ-line   P..KG...I. S.YHS.STY.N....S .VT.SV.......S.

                       Rch 3                CDR 3        Rch 4
7C10 VH mouse     KLNSVTNEDTATYYCAR YGRVFFDY          WGQGTTLTVSS
human Kabat sgII  ..S...AA...V..... ELPGGYDV          .....LV....
human VH FUR1'CL  Q.R...AA...V..... GRYCSSTSCNWFDP   .....LV....
human Germline    ..S...AA...V.....
```

FIGURE 23

```
                                                    30  CDR 1                48
7C10 VH mouse   DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSIT GGYLWN WIRQFPGNKLEWMG
human germline  Q.............ET.....T.S....S S..Y.G ....P..KG...I.
VH Humanized 1  Q.............ET.....T.S..... ...... ....P..KG.....
VH Humanized 2  Q.............ET.....T.S..... ...... ....P..KG...I.
VH Humanized 3  Q.............ET.....T.S....S ...... ....P..KG...I.

                     CDR 2          67   71
7C10 VH mouse   YISYDGTNNYKPSLKD RISITRDTSKNQFFLKLNSVTNEDTATYYCAR
human germline  S.FHS.SSY.N....S .VT.SV.......S...S...AA...V.....
VH Humanized 1  ................. ..T.S.........S...S...AA...V.....
VH Humanized 2  ................. .VT.S.........S...S...AA...V.....
VH Humanized 3  ................. .VT.SV.......S...S...AA...V.....

                     CDR 3
7C10 VH mouse     YGRVFFDY  WGQGTTLTVSS
human germline
VH Humanized 1    ........  .....LV....
VH Humanized 2    ........  .....LV....
VH Humanized 3    ........  .....LV....
```

FIGURE 24

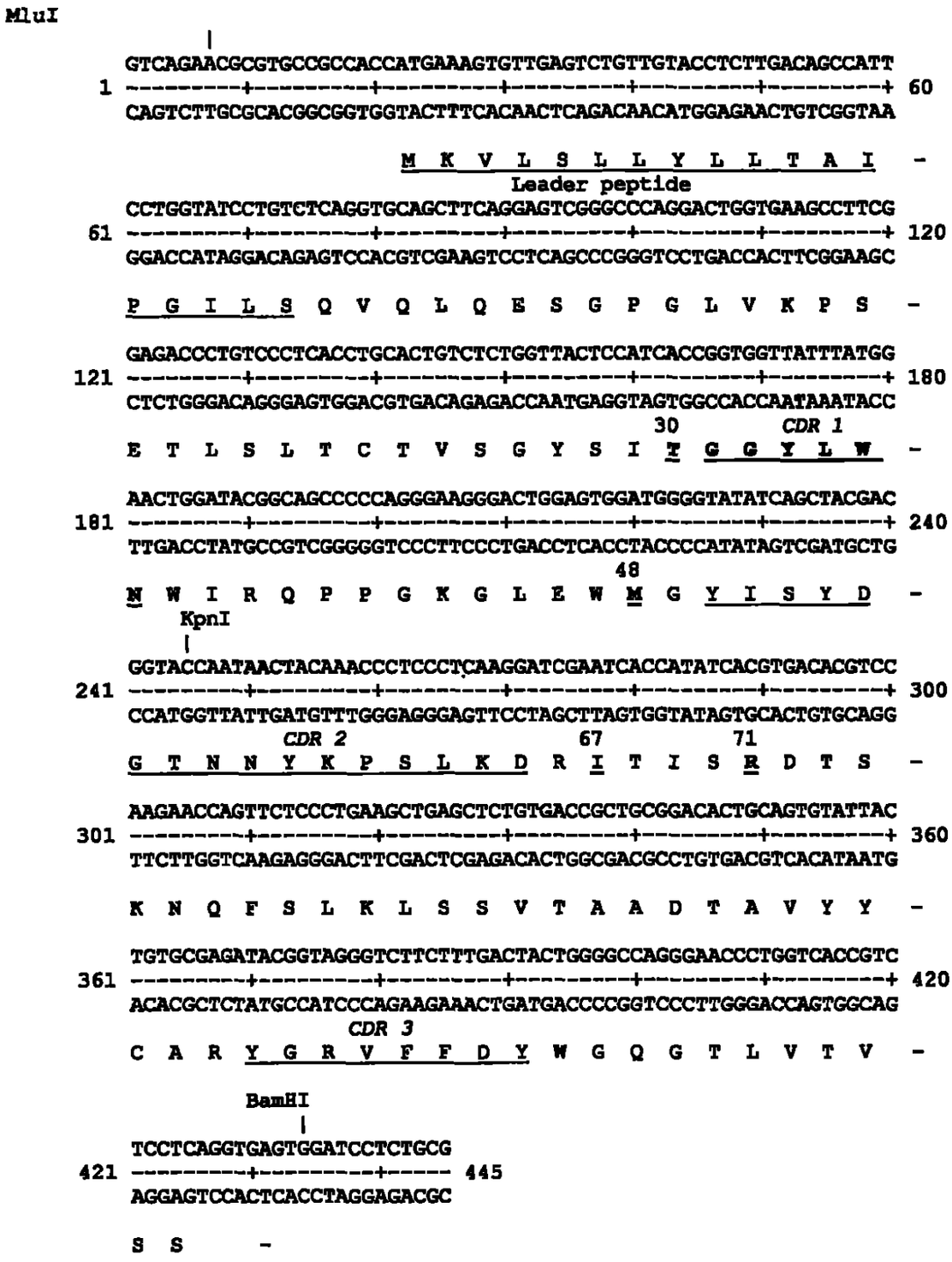

MluI
GTCAGAACGCGTGCCGCCACCATGAAAGTGTTGAGTCTGTTGTACCTCTTGACAGCCATT
CAGTCTTGCGCACGGCGGTGGTACTTTCACAACTCAGACAACATGGAGAACTGTCGGTAA
M K V L S L L Y L L T A I -
Leader peptide
CCTGGTATCCTGTCTCAGGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG
GGACCATAGGACAGAGTCCACGTCGAAGTCCTCAGCCCGGGTCCTGACCACTTCGGAAGC
P G I L S Q V Q L Q E S G P G L V K P S -
GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTTACTCCATCACCGGTGGTTATTTATGG
CTCTGGGACAGGGAGTGGACGTGACAGAGACCAATGAGGTAGTGGCCACCAATAAATACC
30 CDR 1
E T L S L T C T V S G Y S I T G G Y L W -
AACTGGATACGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCAGCTACGAC
TTGACCTATGCCGTCGGGGGTCCCTTCCCTGACCTCACCTACCCCATATAGTCGATGCTG
48
N W I R Q P P G K G L E W M G Y I S Y D -
KpnI
GGTACCAATAACTACAAACCCTCCCTCAAGGATCGAATCACCATATCACGTGACACGTCC
CCATGGTTATTGATGTTTGGGAGGGAGTTCCTAGCTTAGTGGTATAGTGCACTGTGCAGG
CDR 2 67 71
G T N N Y K P S L K D R I T I S R D T S -
AAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACTGCAGTGTATTAC
TTCTTGGTCAAGAGGGACTTCGACTCGAGACACTGGCGACGCCTGTGACGTCACATAATG
K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y -
TGTGCGAGATACGGTAGGGTCTTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
ACACGCTCTATGCCATCCCAGAAGAAACTGATGACCCCGGTCCCTTGGGACCAGTGGCAG
CDR 3
C A R Y G R V F F D Y W G Q G T L V T V -
BamHI
TCCTCAGGTGAGTGGATCCTCTGCG
AGGAGTCCACTCACCTAGGAGACGC
S S -

FIGURE 25

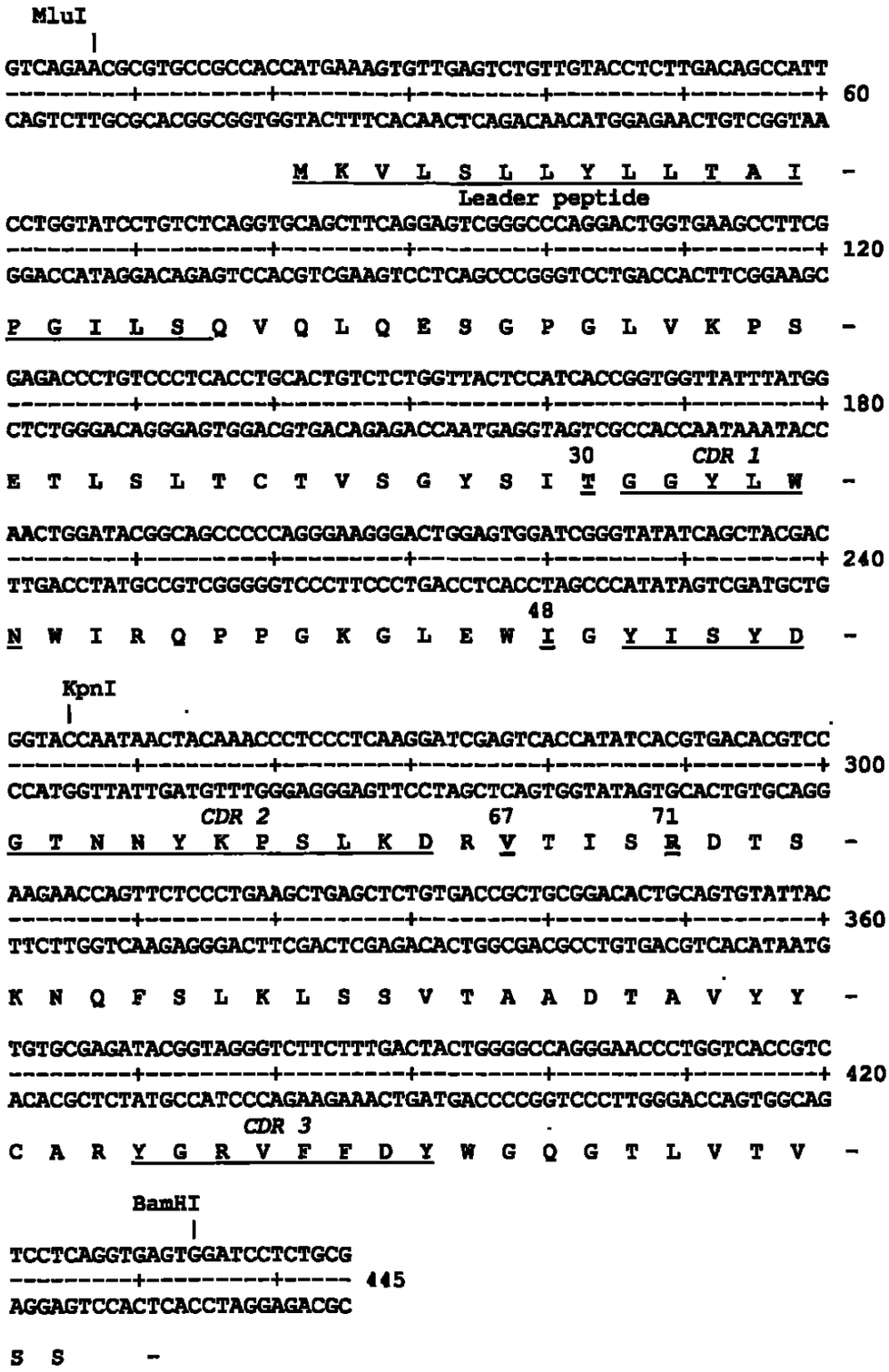

MluI
GTCAGAACGCGTGCCGCCACCATGAAAGTGTTGAGTCTGTTGTACCTCTTGACAGCCATT
CAGTCTTGCGCACGGCGGTGGTACTTTCACAACTCAGACAACATGGAGAACTGTCGGTAA
M K V L S L L Y L L T A I
Leader peptide
CCTGGTATCCTGTCTCAGGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG
GGACCATAGGACAGAGTCCACGTCGAAGTCCTCAGCCCGGGTCCTGACCACTTCGGAAGC
P G I L S Q V Q L Q E S G P G L V K P S
GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTTACTCCATCACCGGTGGTTATTTATGG
CTCTGGGACAGGGAGTGGACGTGACAGAGACCAATGAGGTAGTCGCCACCAATAAATACC
30
CDR 1
E T L S L T C T V S G Y S I T G G Y L W
AACTGGATACGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATCGGGTATATCAGCTACGAC
TTGACCTATGCCGTCGGGGGTCCCTTCCCTGACCTCACCTAGCCCATATAGTCGATGCTG
48
N W I R Q P P G K G L E W I G Y I S Y D
KpnI
GGTACCAATAACTACAAACCCTCCCTCAAGGATCGAGTCACCATATCACGTGACACGTCC
CCATGGTTATTGATGTTTGGGAGGGAGTTCCTAGCTCAGTGGTATAGTGCACTGTGCAGG
CDR 2
67
71
G T N N Y K P S L K D R V T I S R D T S
AAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACTGCAGTGTATTAC
TTCTTGGTCAAGAGGGACTTCGACTCGAGACACTGGCGACGCCTGTGACGTCACATAATG
K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y
TGTGCGAGATACGGTAGGGTCTTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
ACACGCTCTATGCCATCCCAGAAGAAACTGATGACCCCGGTCCCTTGGGACCAGTGGCAG
CDR 3
C A R Y G R V F F D Y W G Q G T L V T V
BamHI
TCCTCAGGTGAGTGGATCCTCTGCG
AGGAGTCCACTCACCTAGGAGACGC
445
S S

FIGURE 26

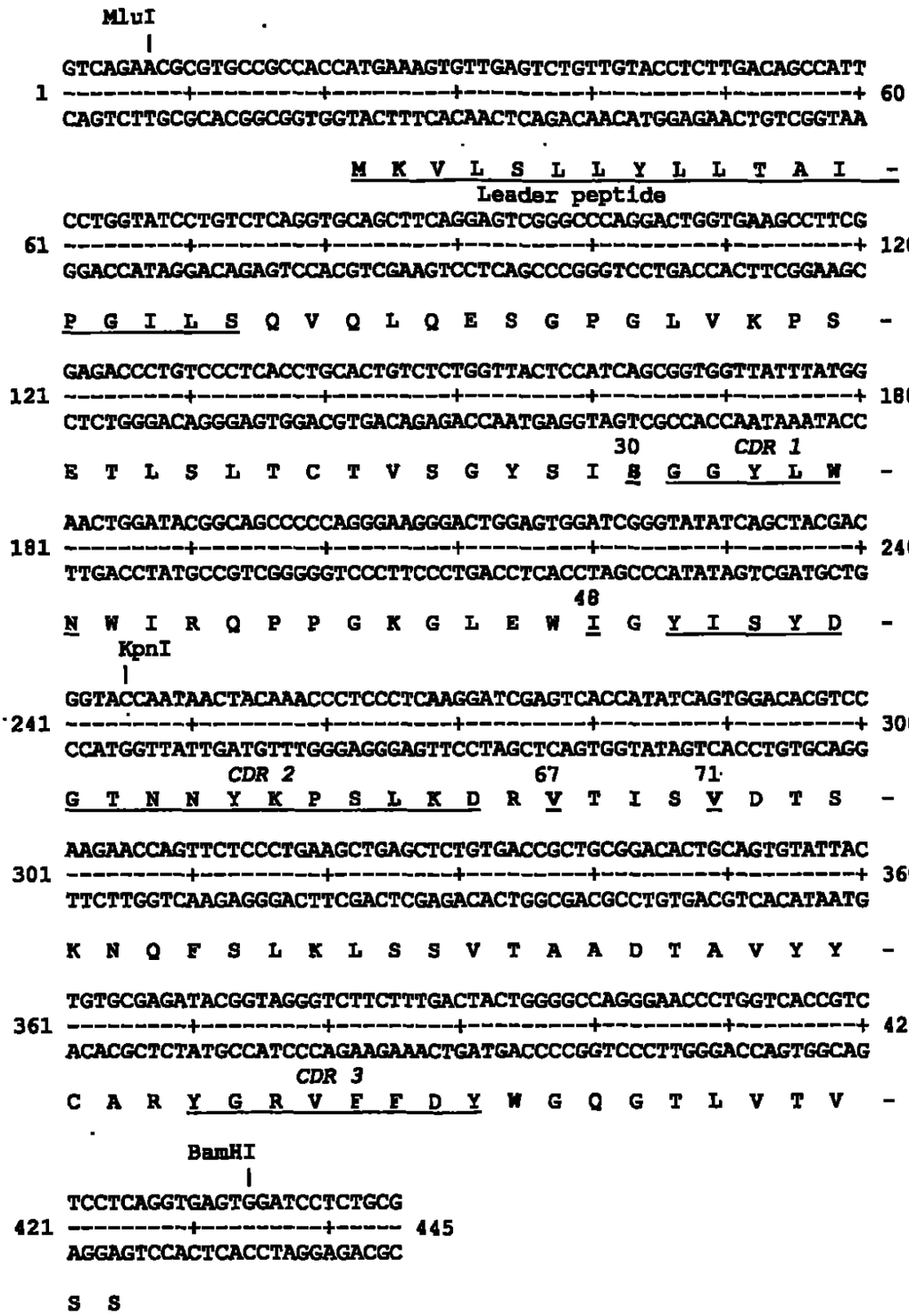

MluI
GTCAGAACGCGTGCCGCCACCATGAAAGTGTTGAGTCTGTTGTACCTCTTGACAGCCATT
CAGTCTTGCGCACGGCGGTGGTACTTTCACAACTCAGACAACATGGAGAACTGTCGGTAA
M K V L S L L Y L L T A I -
Leader peptide
CCTGGTATCCTGTCTCAGGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG
GGACCATAGGACAGAGTCCACGTCGAAGTCCTCAGCCCGGGTCCTGACCACTTCGGAAGC
P G I L S Q V Q L Q E S G P G L V K P S -
GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTTACTCCATCAGCGGTGGTTATTTATGG
CTCTGGGACAGGGAGTGGACGTGACAGAGACCAATGAGGTAGTCGCCACCAATAAATACC
30
CDR 1
E T L S L T C T V S G Y S I S G G Y L W -
AACTGGATACGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATCGGGTATATCAGCTACGAC
TTGACCTATGCCGTCGGGGGTCCCTTCCCTGACCTCACCTAGCCCATATAGTCGATGCTG
48
N W I R Q P P G K G L E W I G Y I S Y D -
KpnI
GGTACCAATAACTACAAACCCTCCCTCAAGGATCGAGTCACCATATCAGTGGACACGTCC
CCATGGTTATTGATGTTTGGGAGGGAGTTCCTAGCTCAGTGGTATAGTCACCTGTGCAGG
CDR 2
67
71
G T N N Y K P S L K D R V T I S V D T S -
AAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACTGCAGTGTATTAC
TTCTTGGTCAAGAGGGACTTCGACTCGAGACACTGGCGACGCCTGTGACGTCACATAATG
K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y -
TGTGCGAGATACGGTAGGGTCTTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
ACACGCTCTATGCCATCCCAGAAGAAACTGATGACCCCGGTCCCTTGGGACCAGTGGCAG
CDR 3
C A R Y G R V F F D Y W G Q G T L V T V -
BamHI
TCCTCAGGTGAGTGGATCCTCTGCG
AGGAGTCCACTCACCTAGGAGACGC
445
S S

FIGURE 27

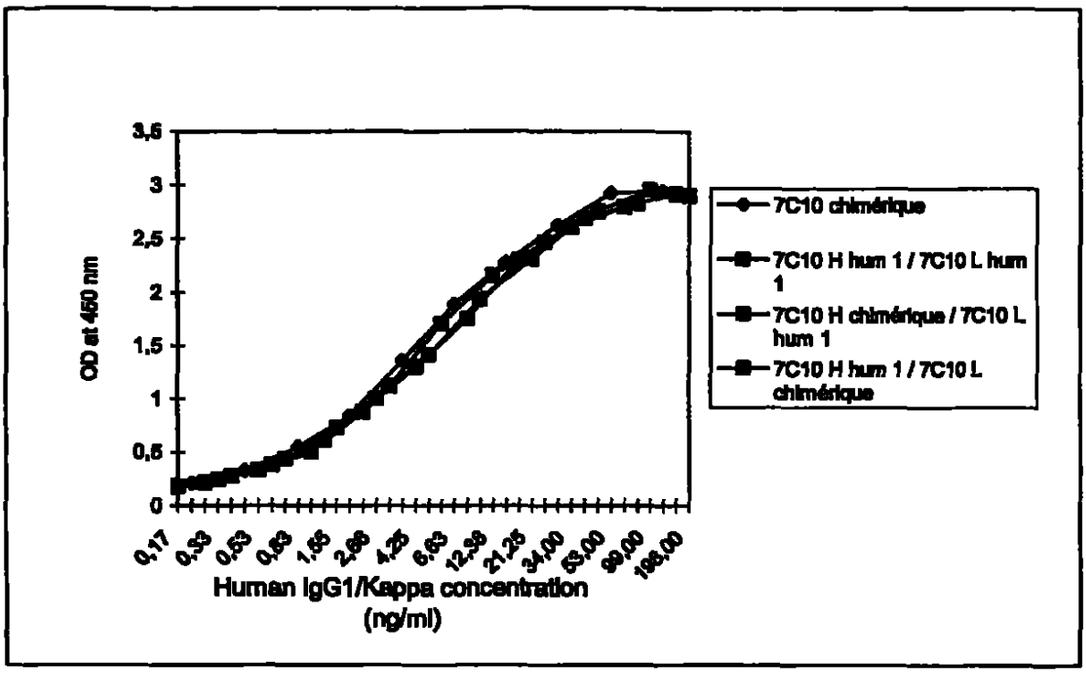


FIGURE 28

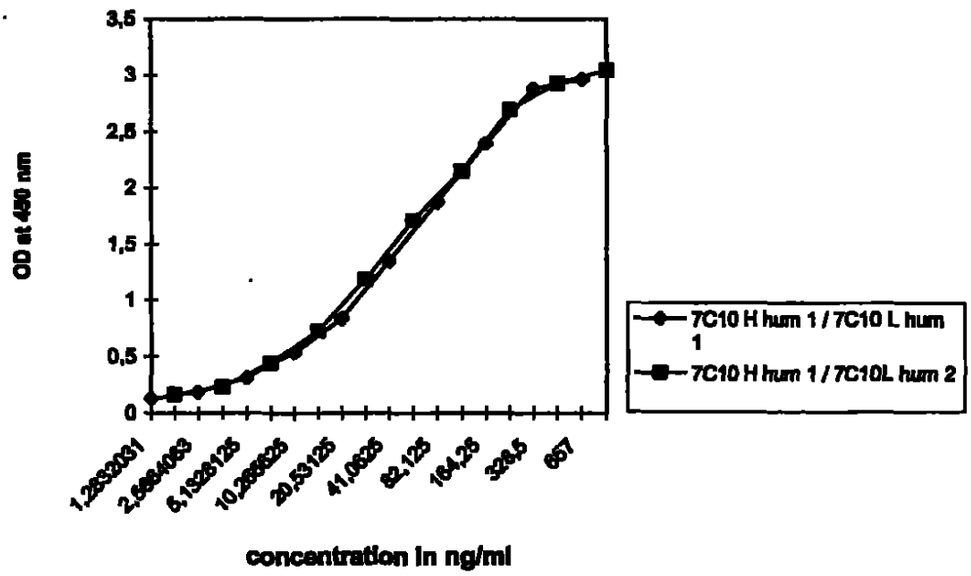


FIGURE 29

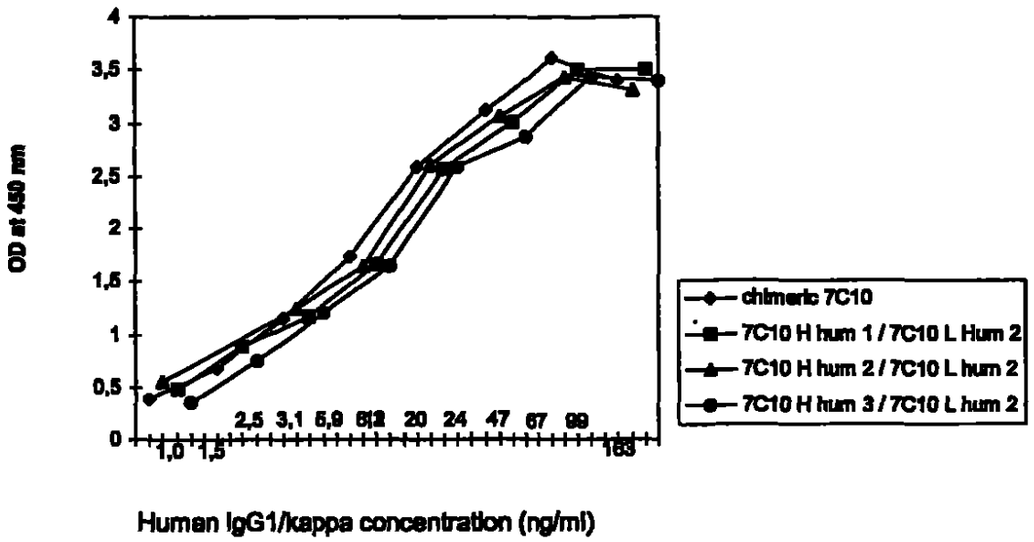


FIGURE 30

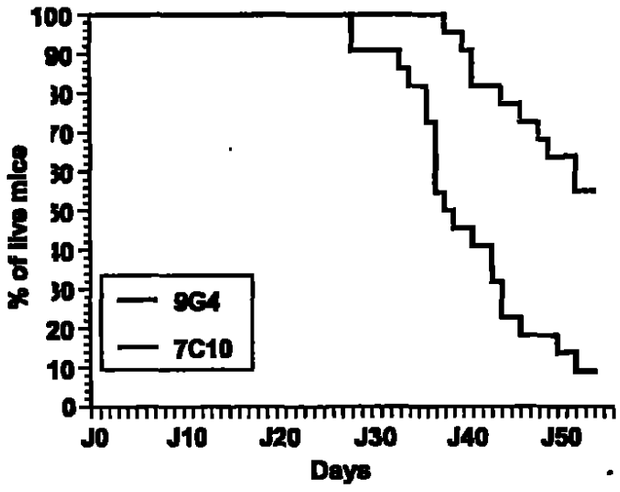


FIGURE 31

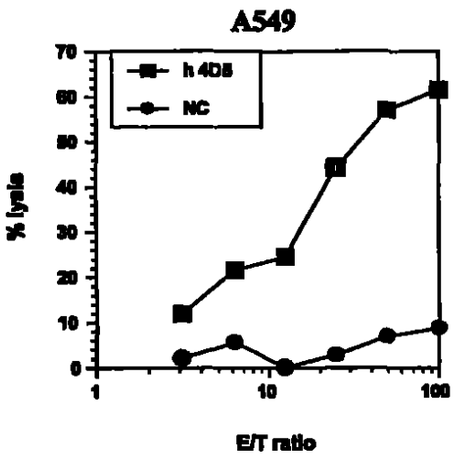


FIGURE 32A

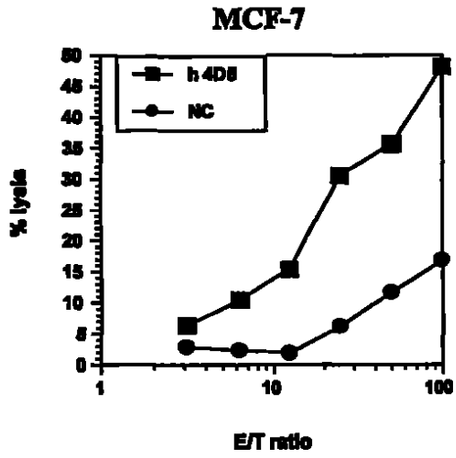


FIGURE 32B

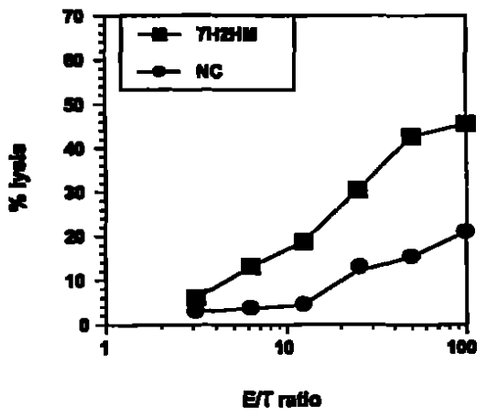


FIGURE 32C

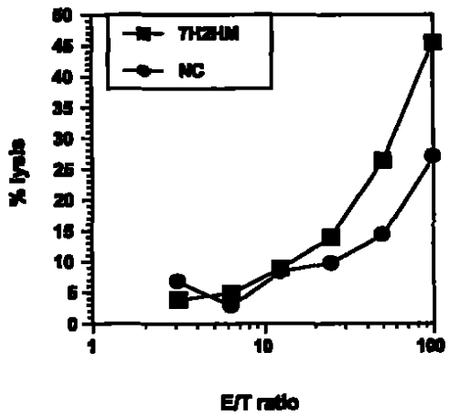


FIGURE 32D

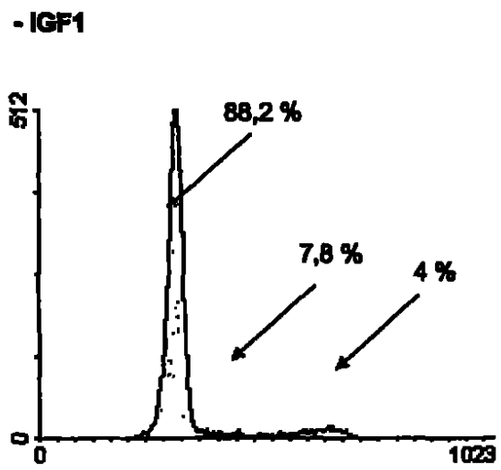


FIGURE 33A

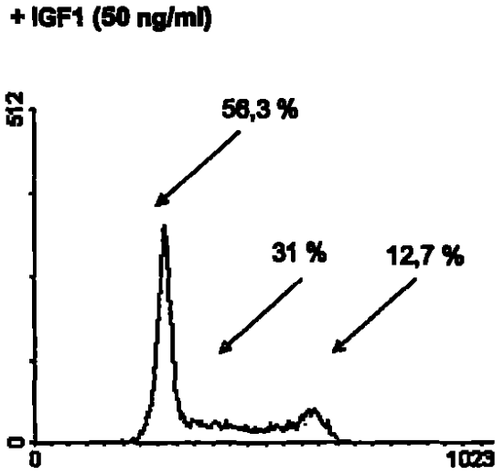


FIGURE 33B

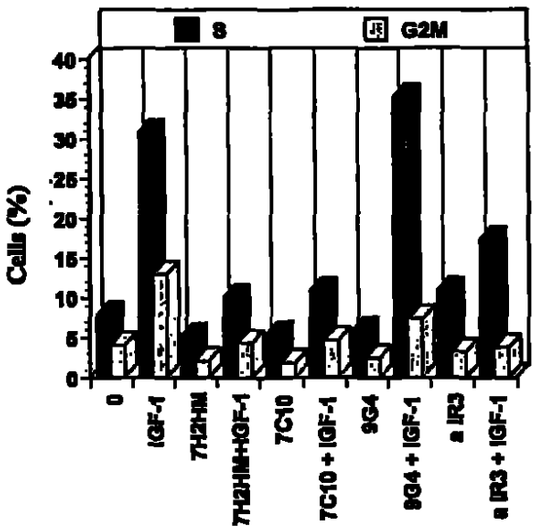


FIGURE 33C

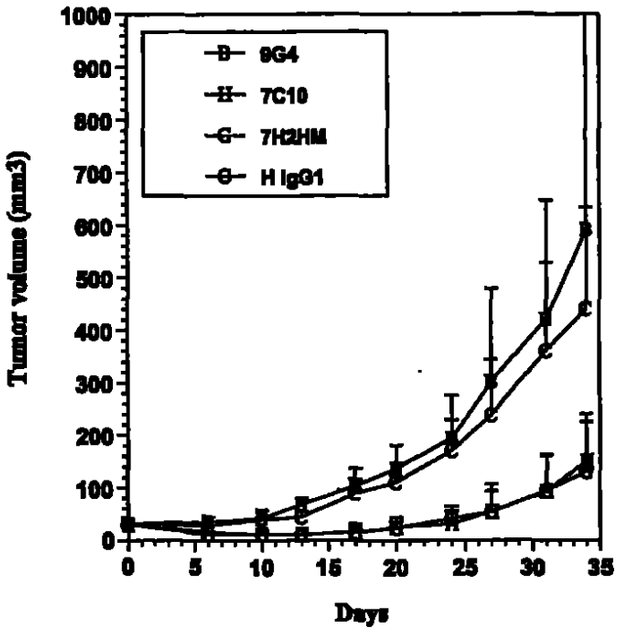


FIGURE 34A

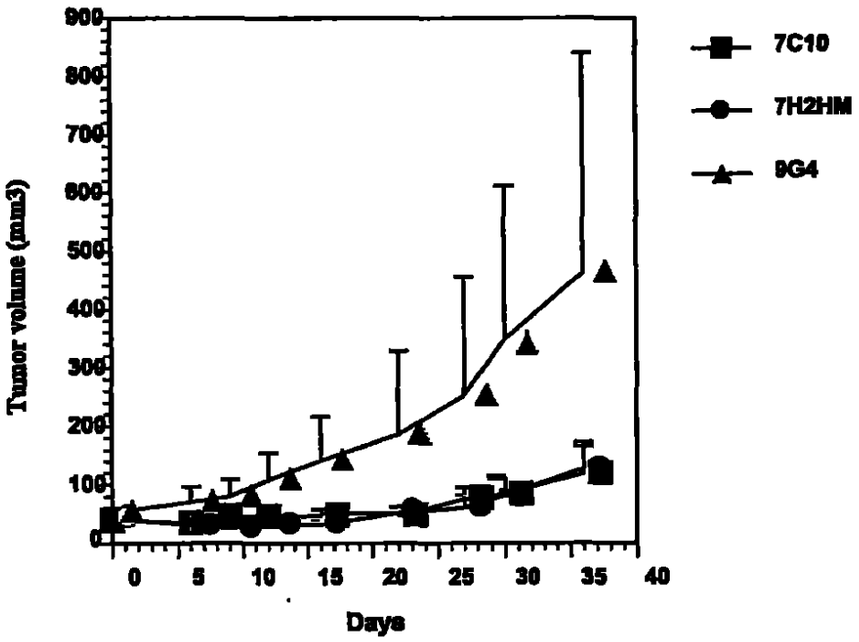


FIGURE 34B

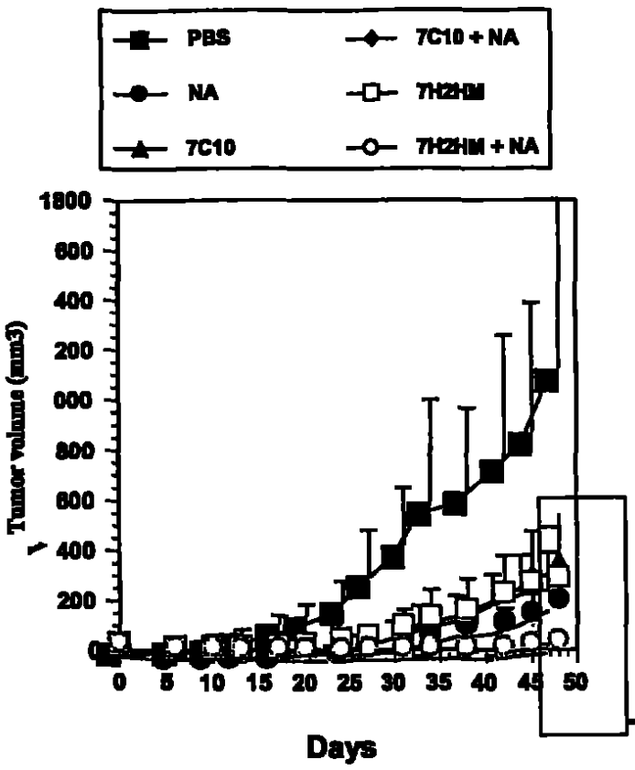


FIGURE 35A

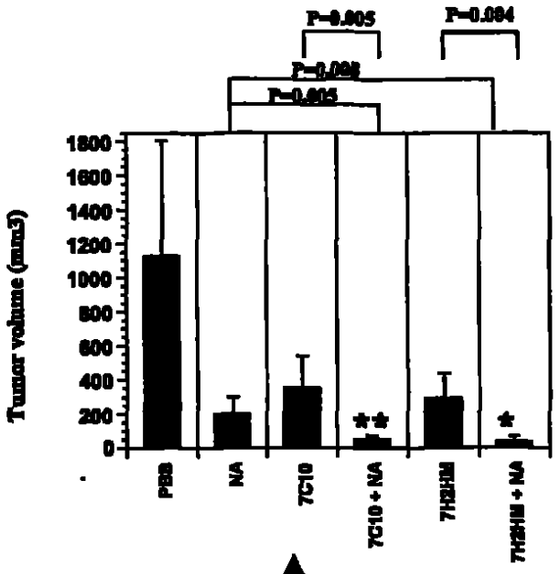


FIGURE 35B

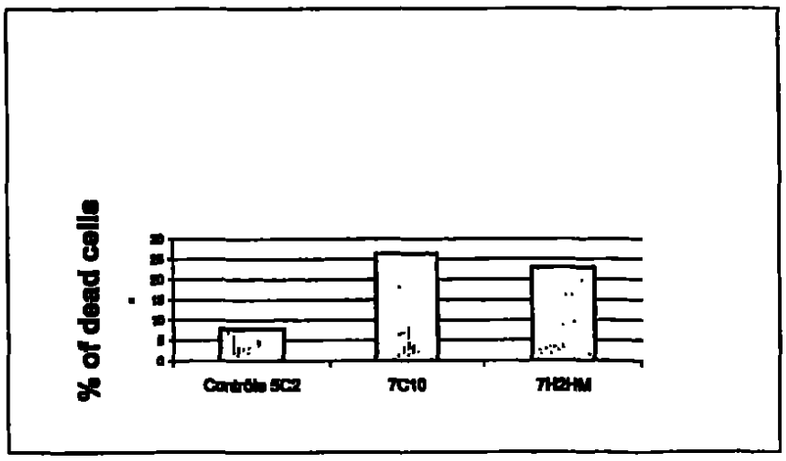


FIGURE 36

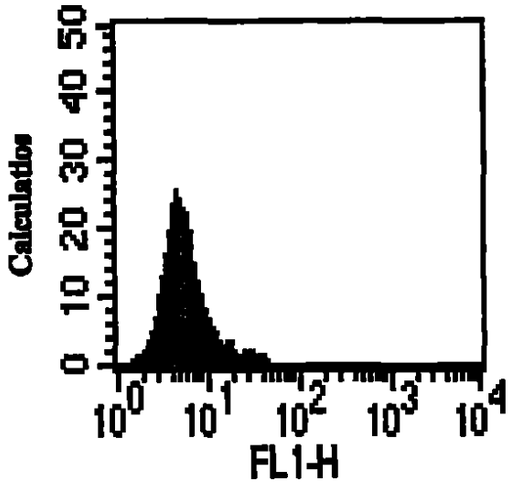


FIGURE 37A

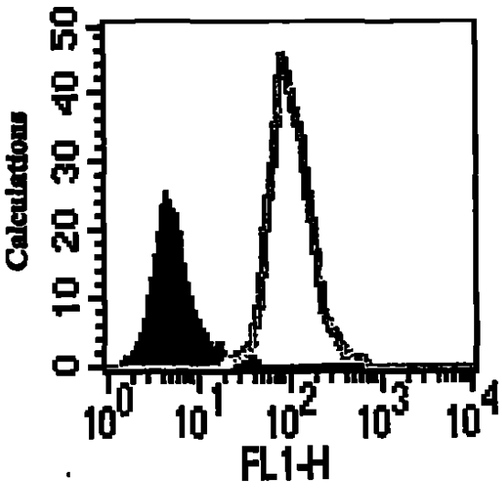


FIGURE 37B

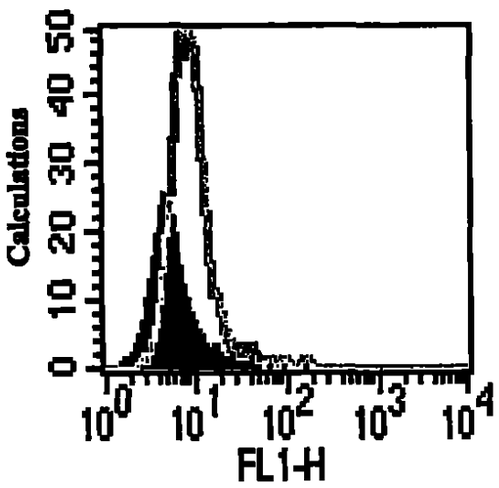


FIGURE 37C

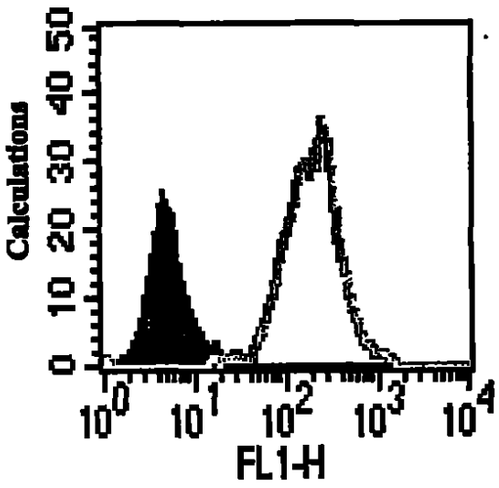


FIGURE 37D

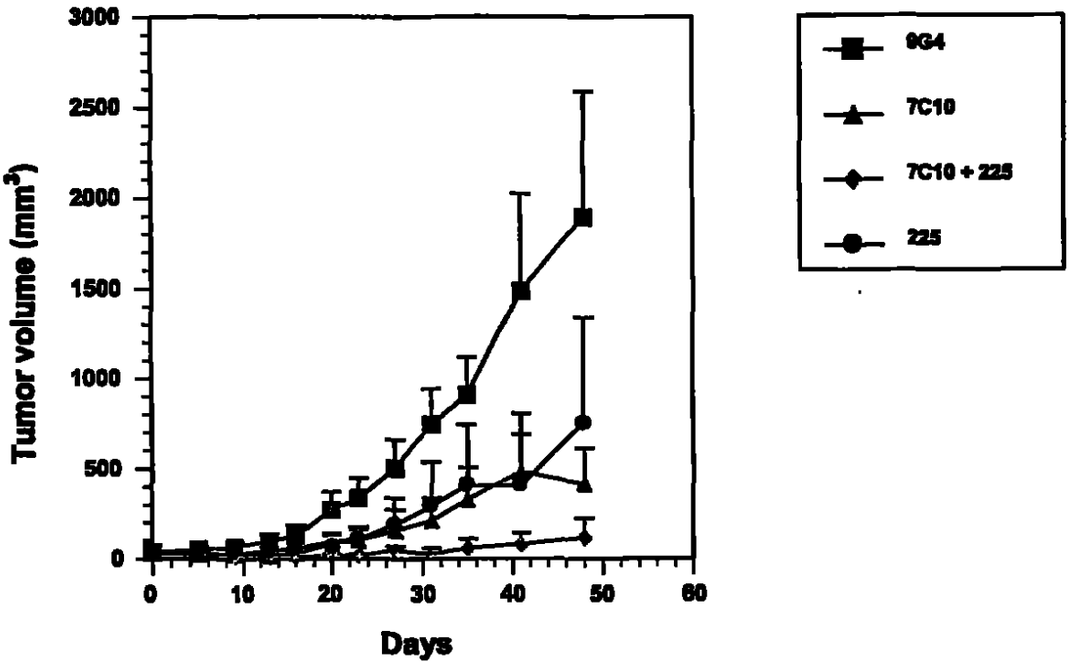


FIGURE 38

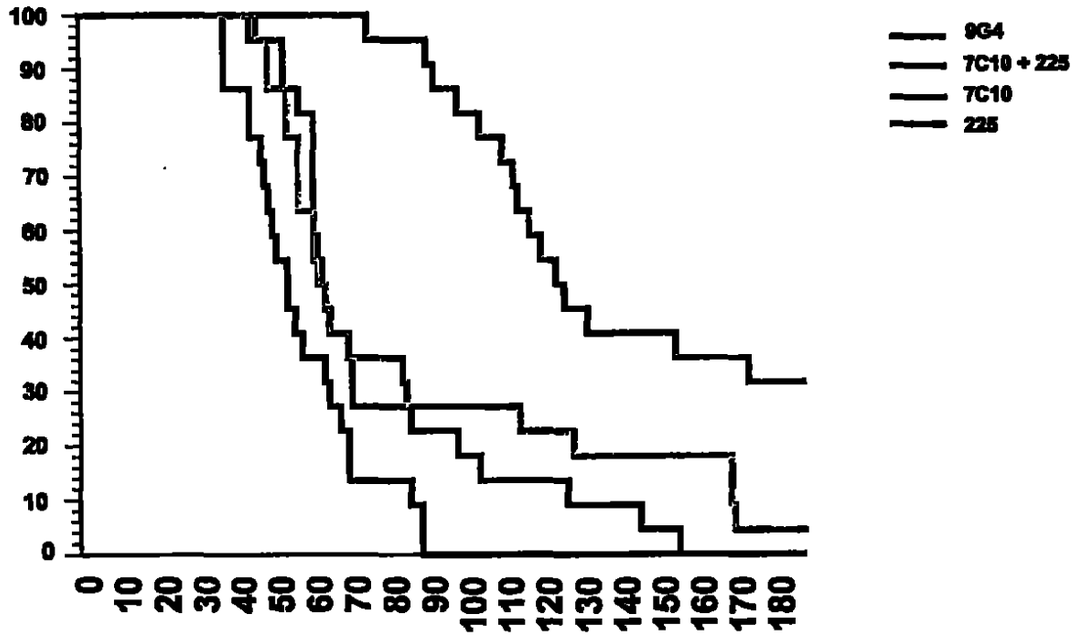


FIGURE 39

FIGURE 40A

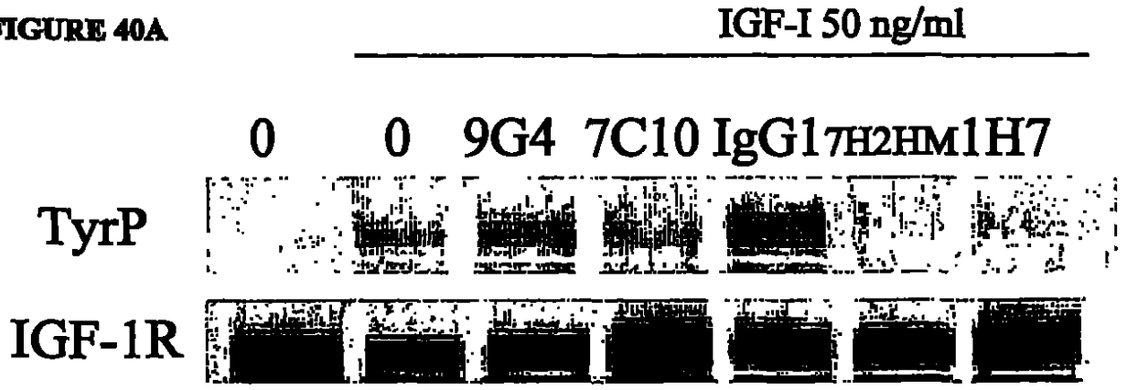
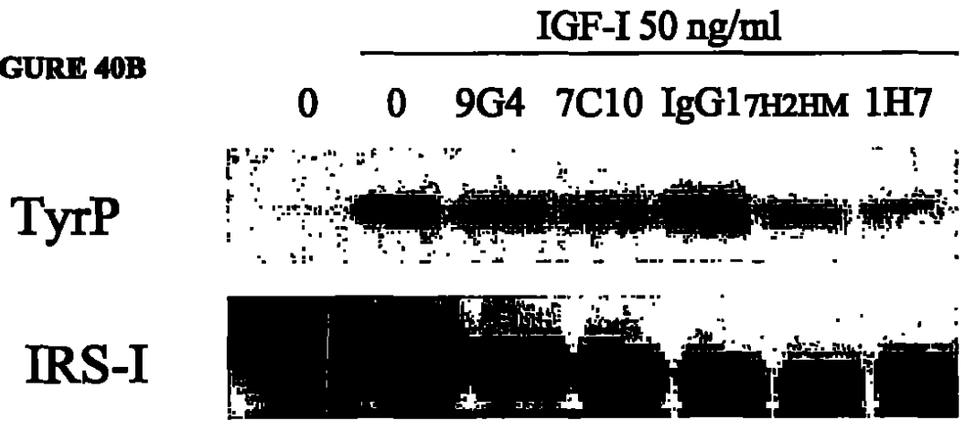


FIGURE 40B



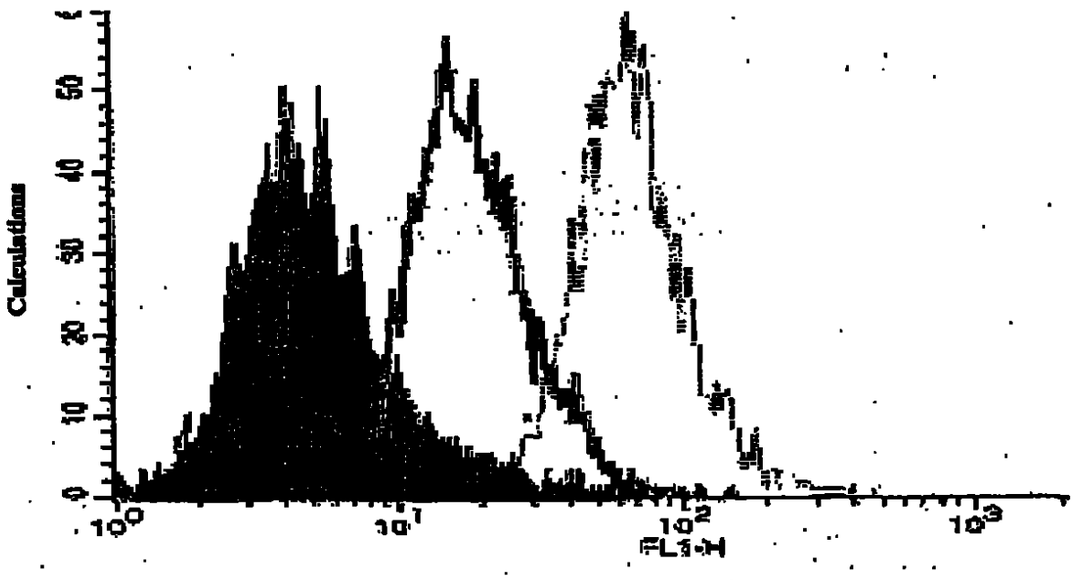


FIGURE 41

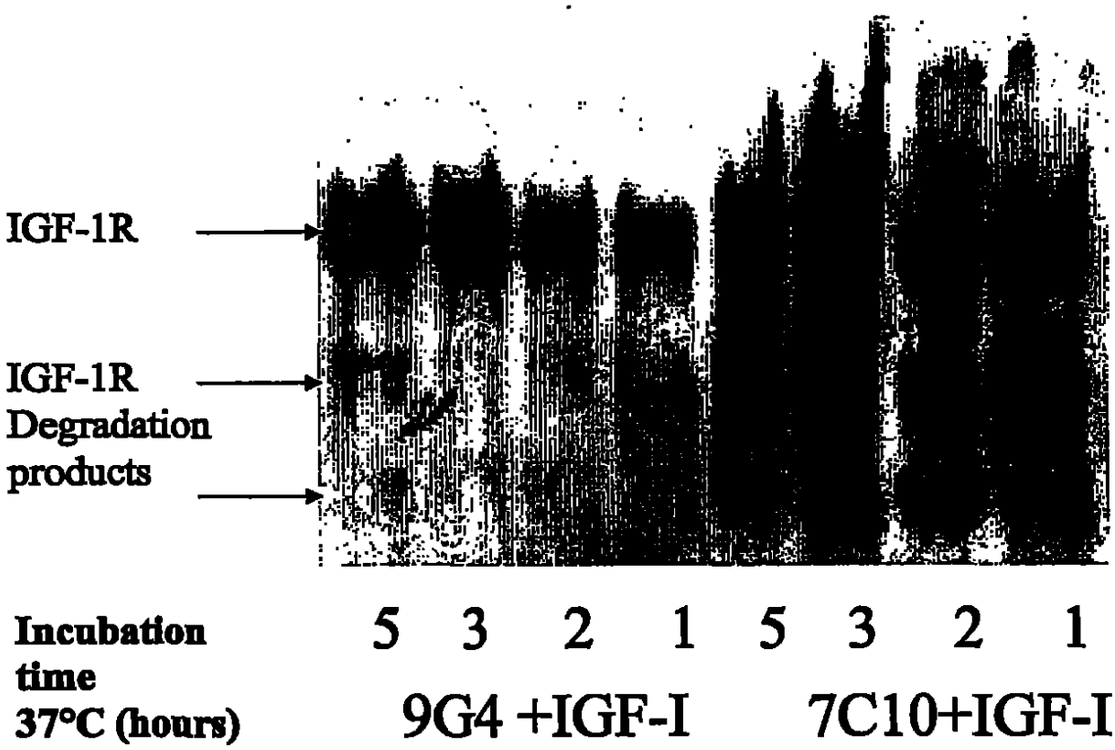


FIGURE 42A

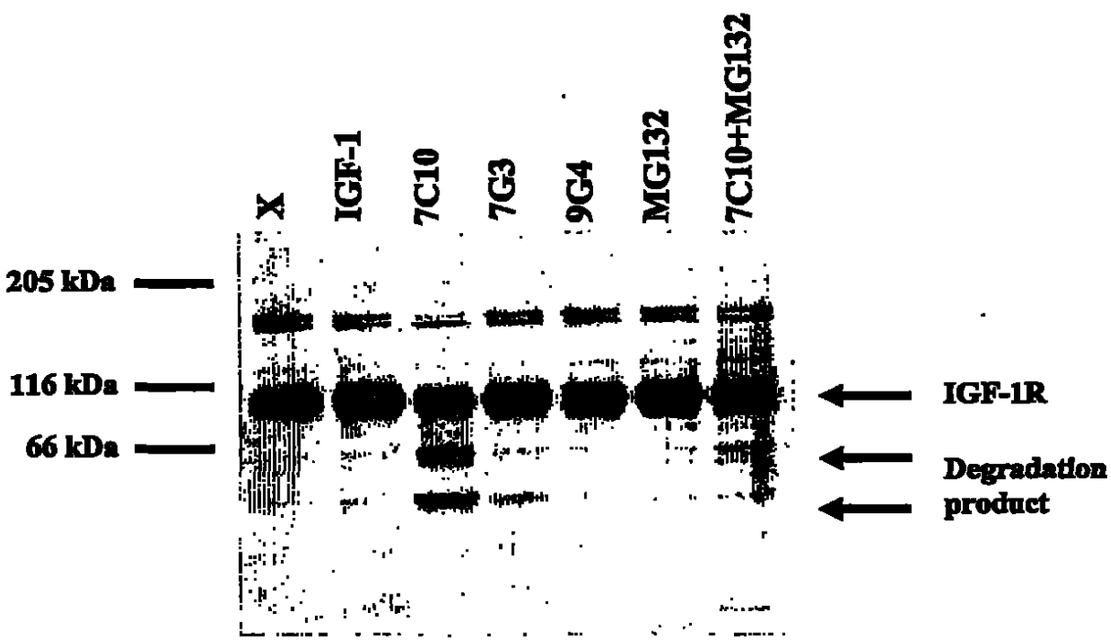


FIGURE 42B

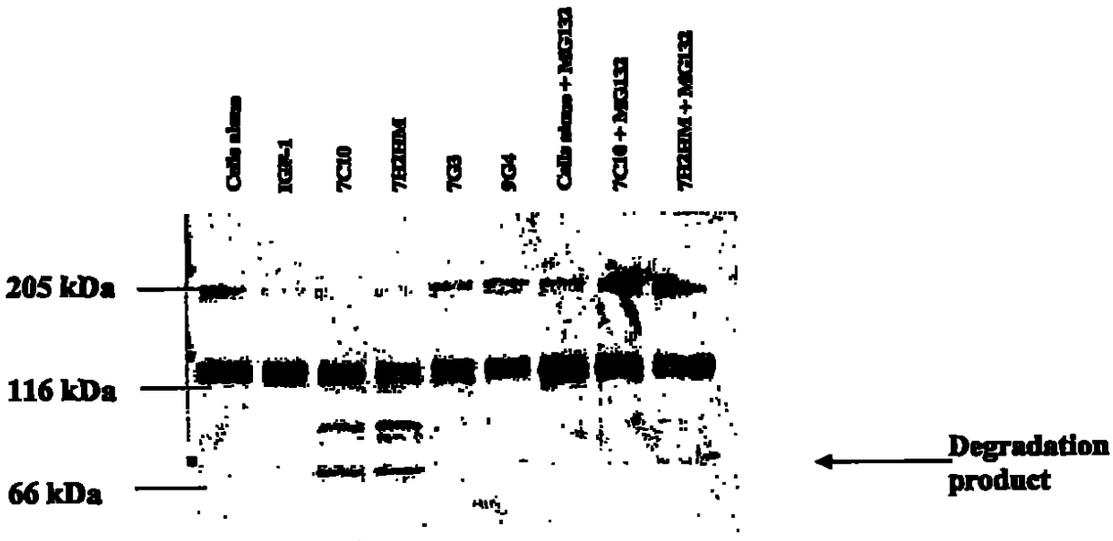

Cells alone
IGF-1
7C10
7B2HM
7C3
9G4
Cells alone + MG132
7C10 + MG132
7B2HM + MG132
205 kDa
116 kDa
66 kDa
Degradation product

FIGURE 42C

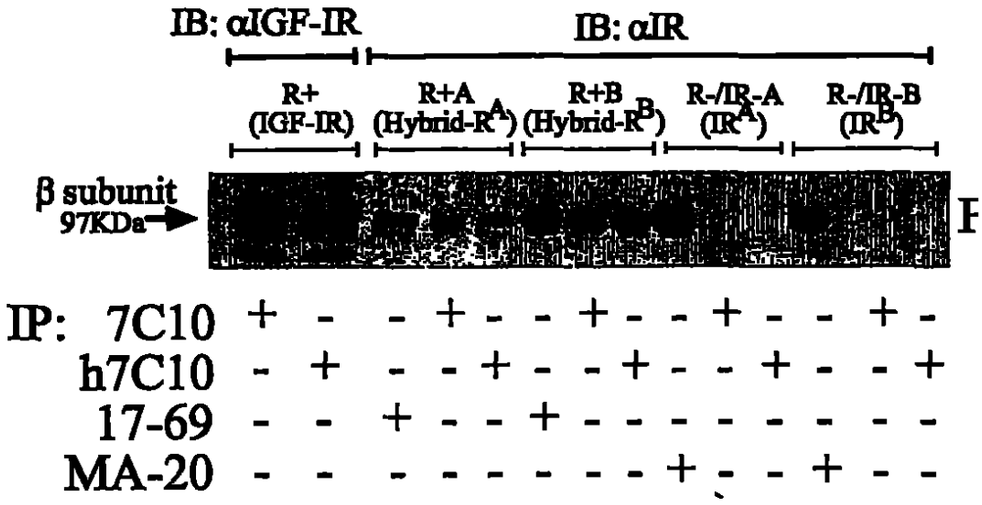


FIGURE 43A

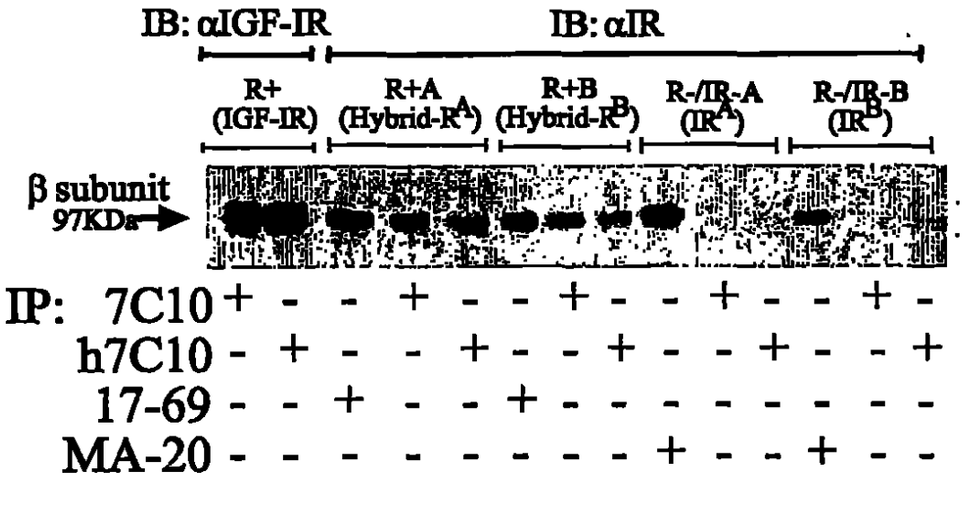


FIGURE 43B

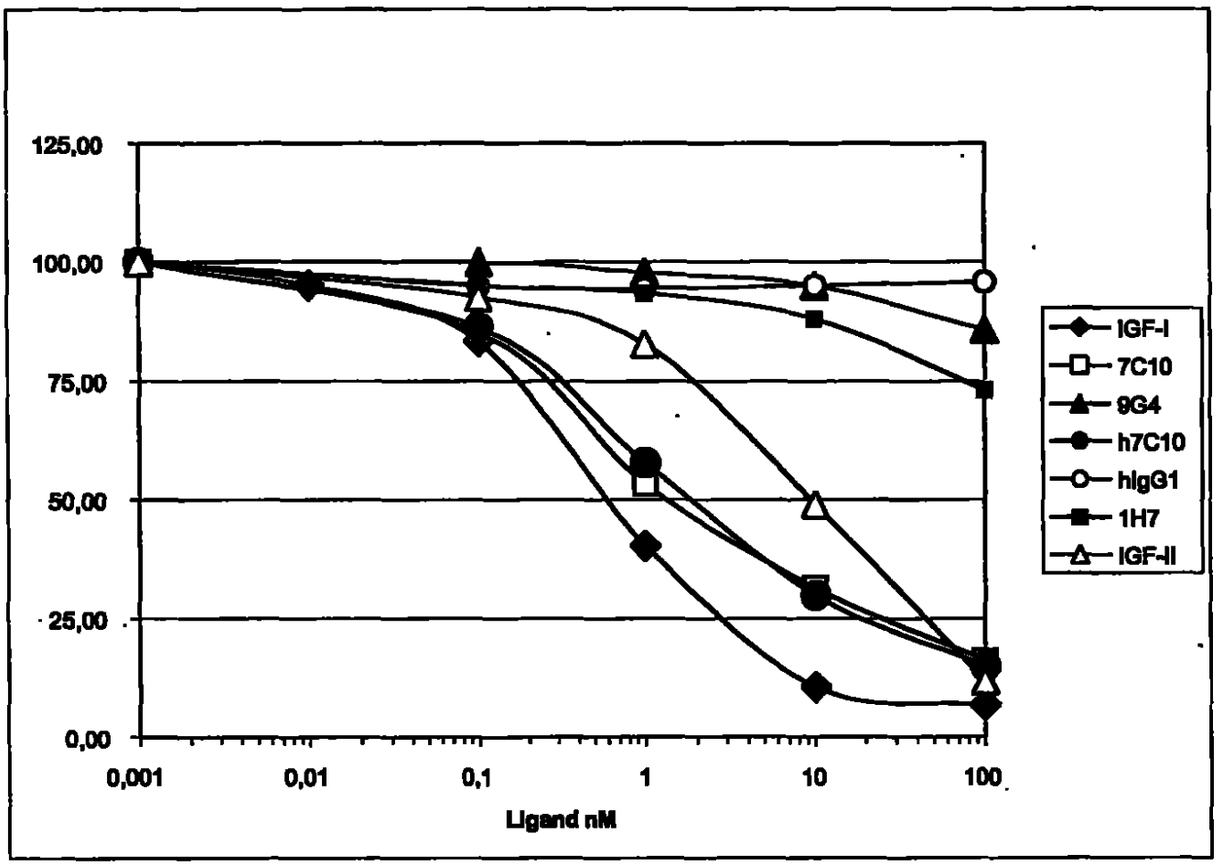

125,00
100,00
75,00
50,00
25,00
0,00
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Ligand nM
IGF-I
7C10
9G4
h7C10
hIgG1
1H7
IGF-II

FIGURE 44

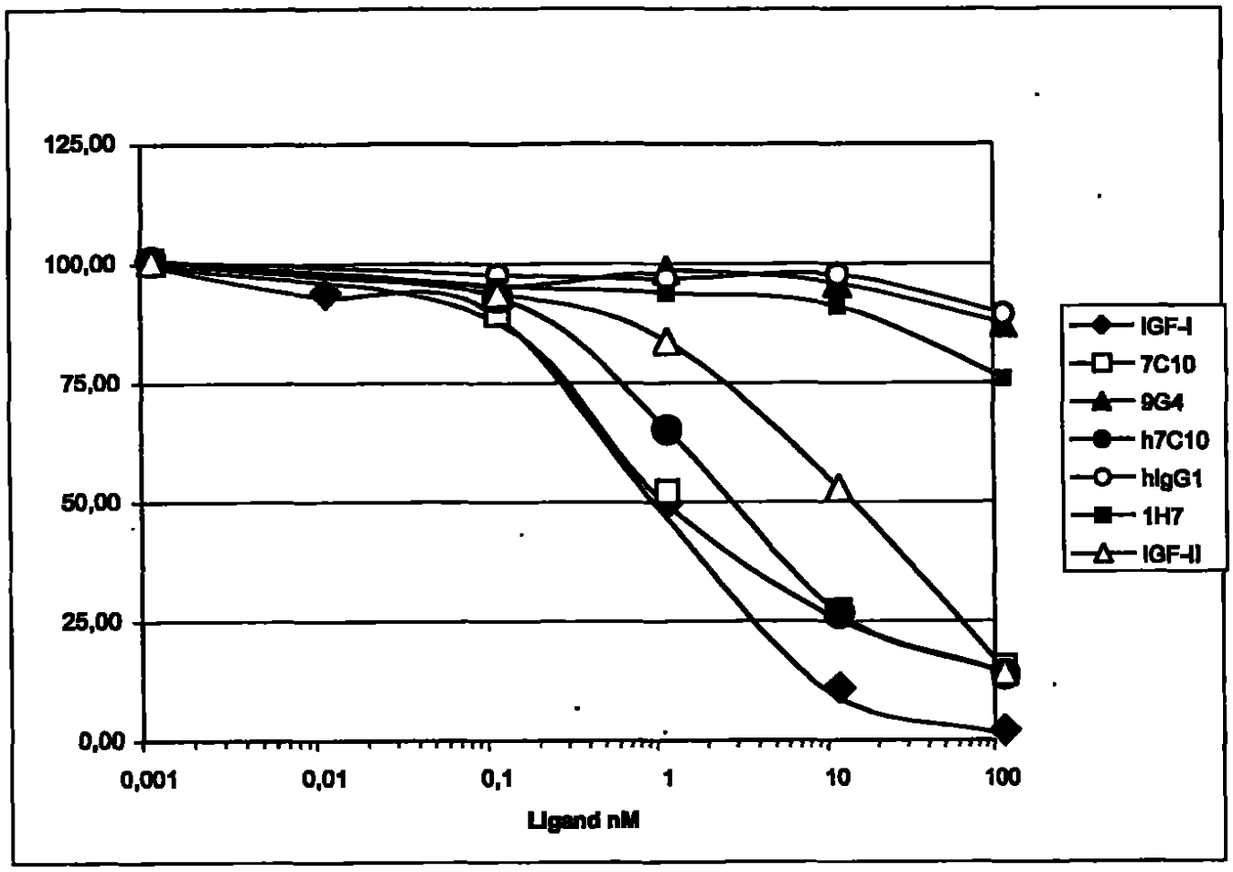

125,00
100,00
75,00
50,00
25,00
0,00
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Ligand nM
IGF-I
7C10
9G4
h7C10
hIgG1
1H7
IGF-II

FIGURE 45

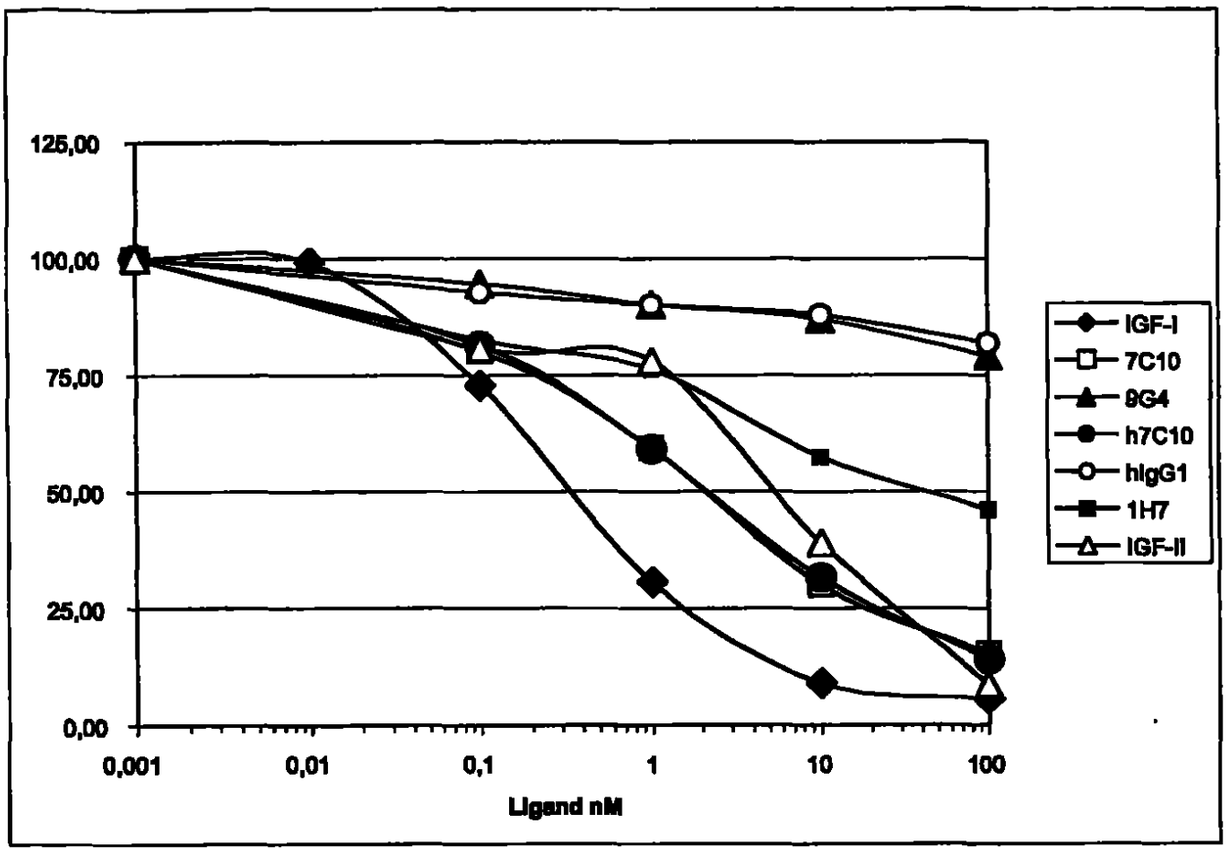

125,00
100,00
75,00
50,00
25,00
0,00
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Ligand nM
IGF-I
7C10
9G4
h7C10
hIgG1
1H7
IGF-II

FIGURE 46

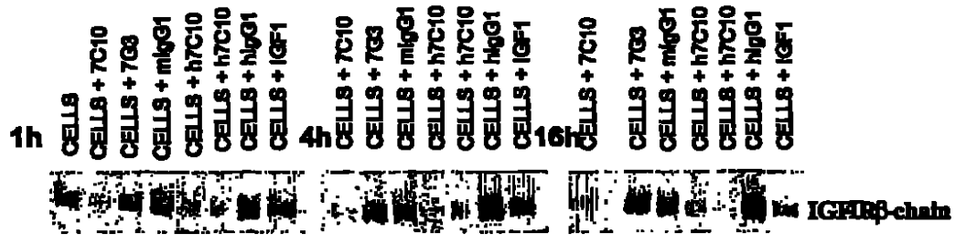


FIGURE 47A

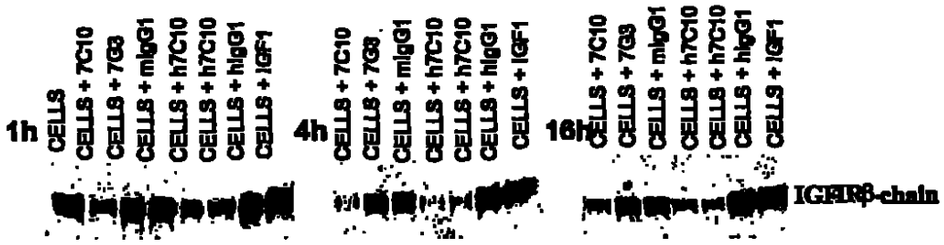


FIGURE 47B

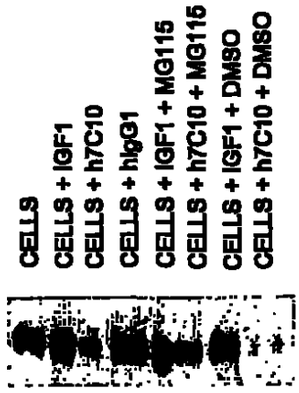


FIGURE 48

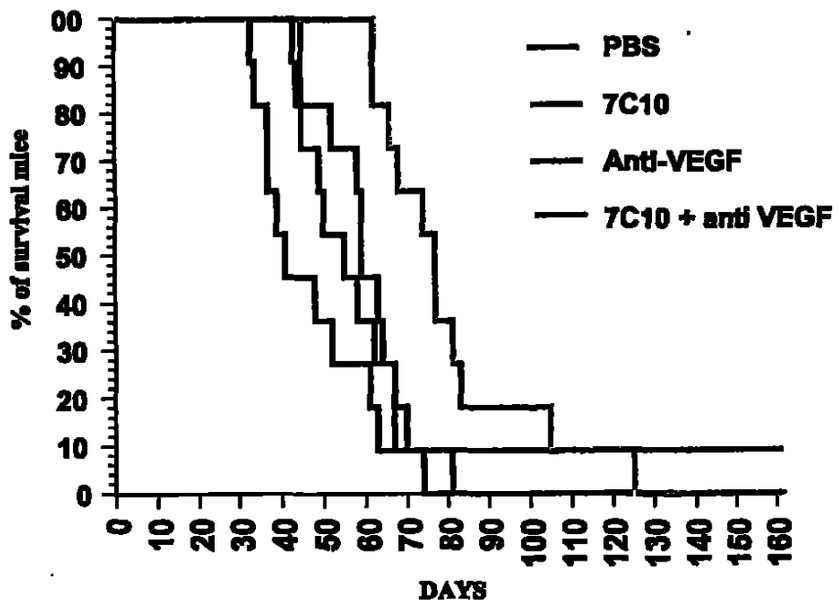


FIGURE 49

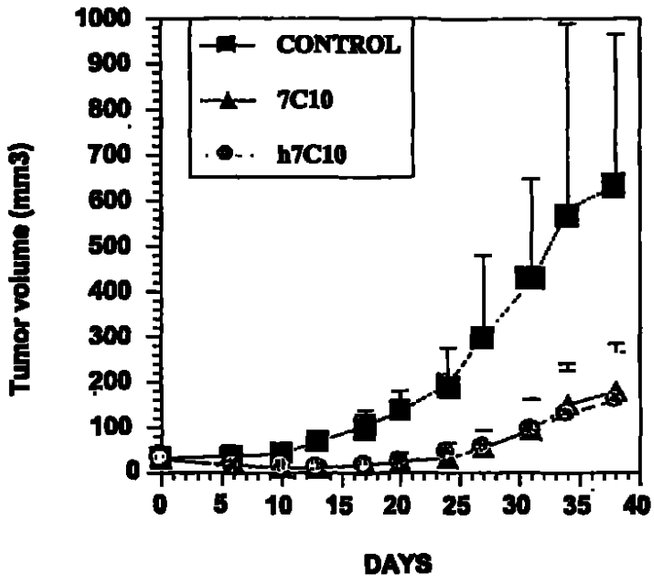


FIGURE 50

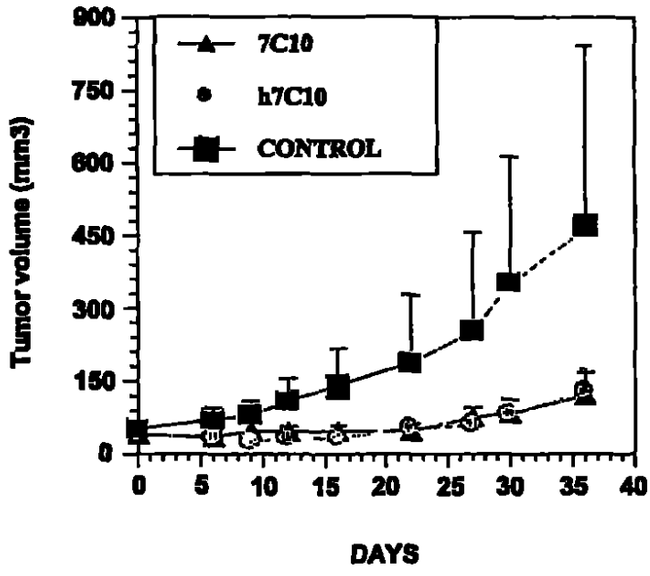


FIGURE 51

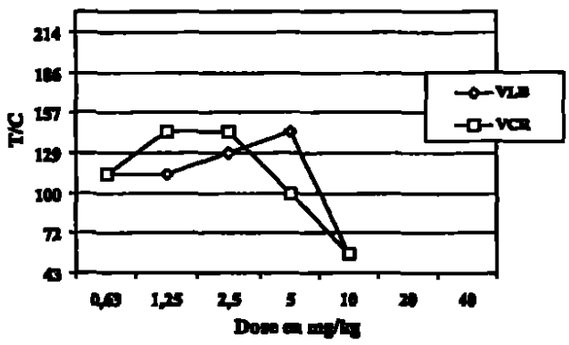


FIGURE 52

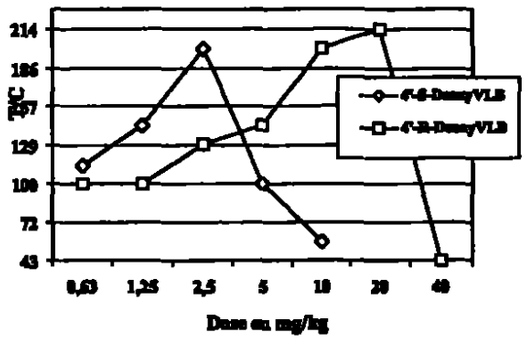


FIGURE 53

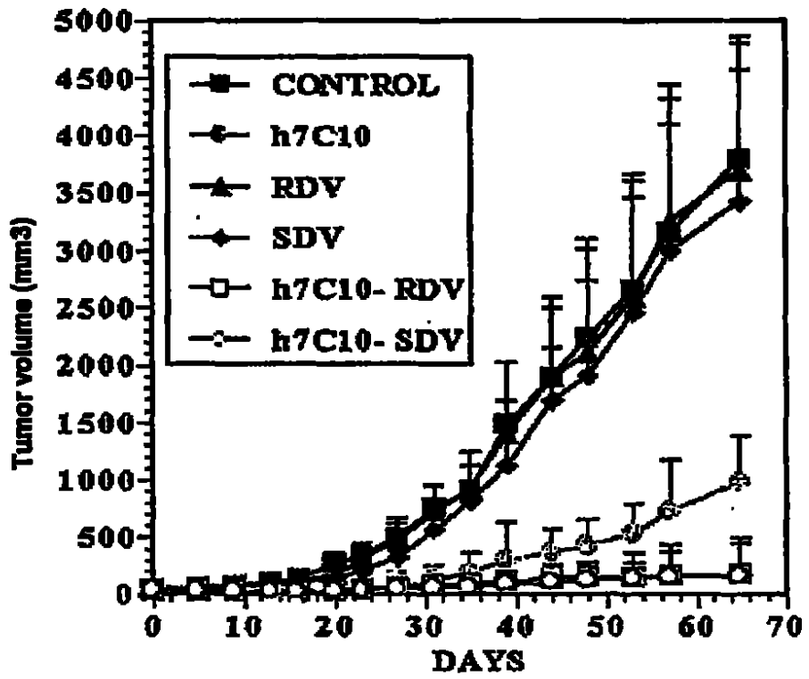


FIGURE 54

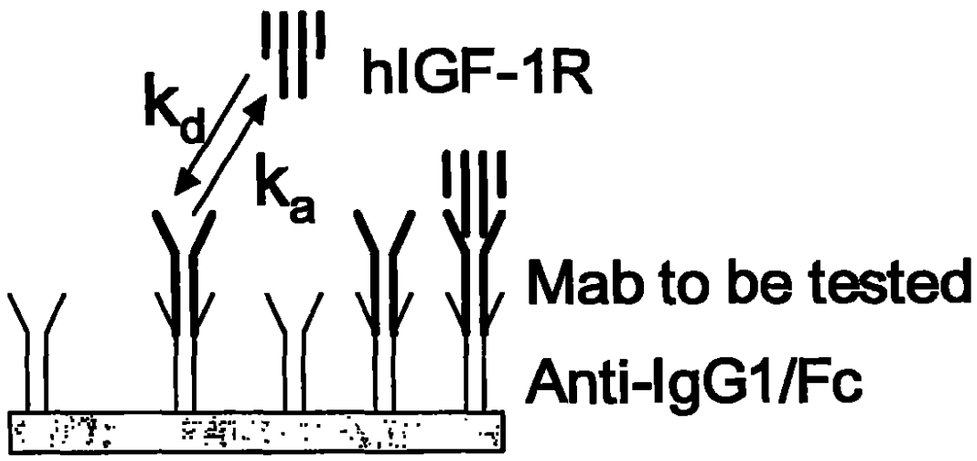


FIGURE 55

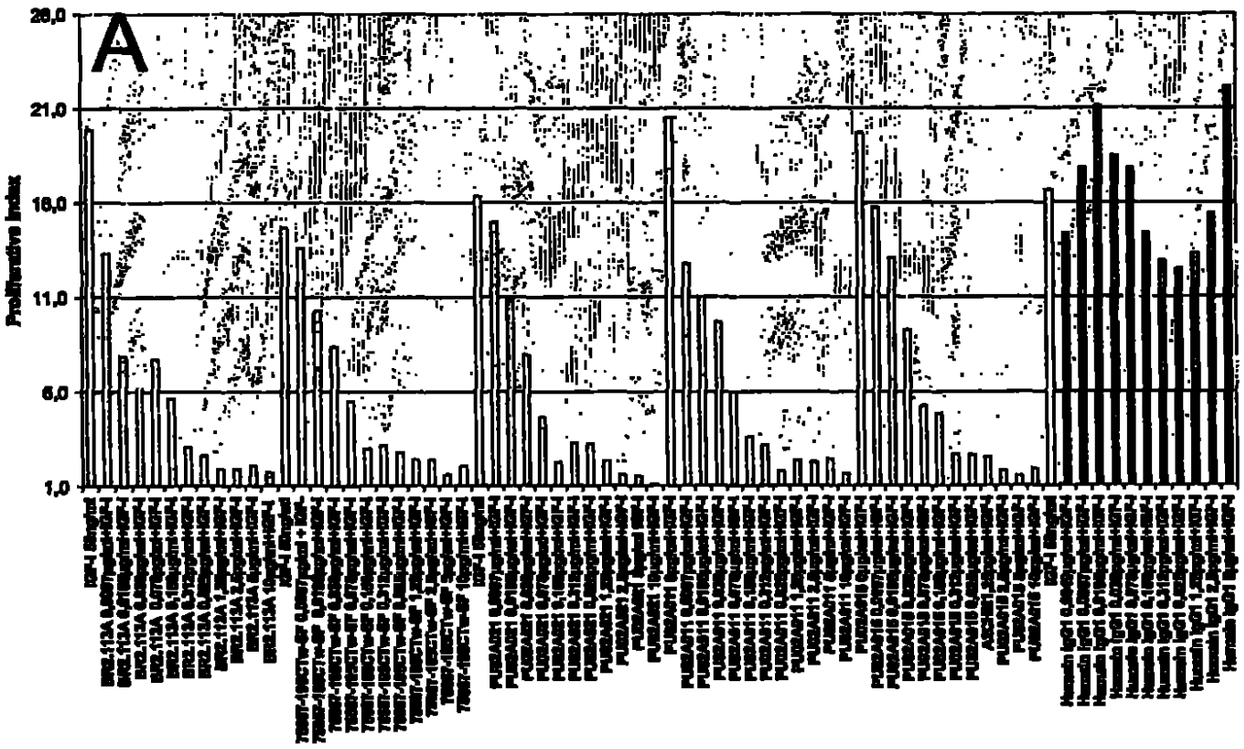


FIGURE 56A

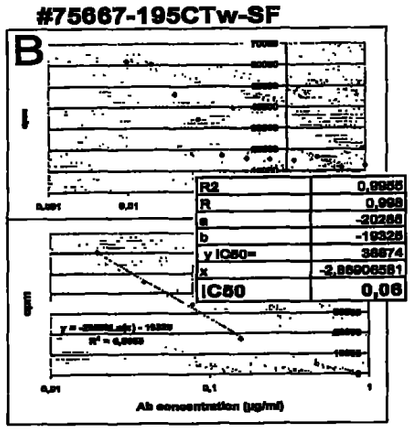


FIGURE 56B

C

Batch Number	IC_{50} value µg/ml (nM)
#75667-195CTw-SF	0.06 (0.40)
#BR2.113A	0.05 (0.33)
#PU02A021	0.04 (0.27)
#PU02A011	0.04 (0.27)
#PU02A015	0.04 (0.27)

FIGURE 56C

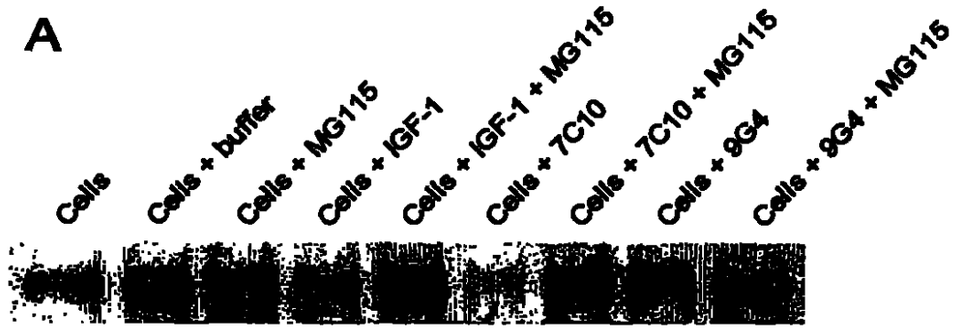


FIGURE 57A

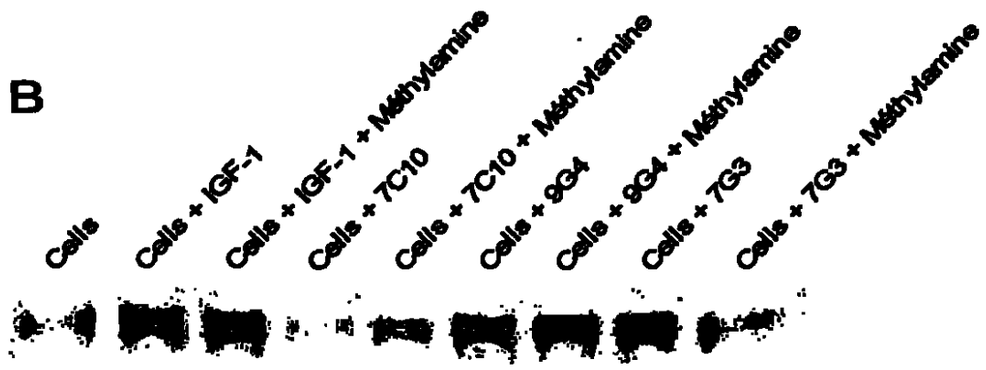


FIGURE 57B

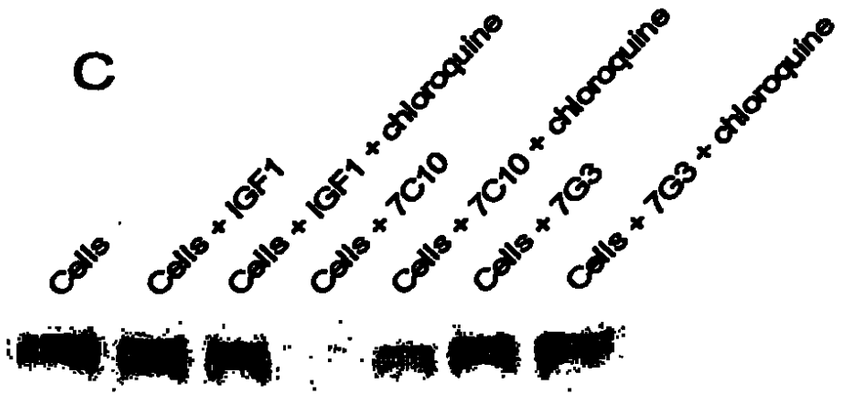


FIGURE 57C

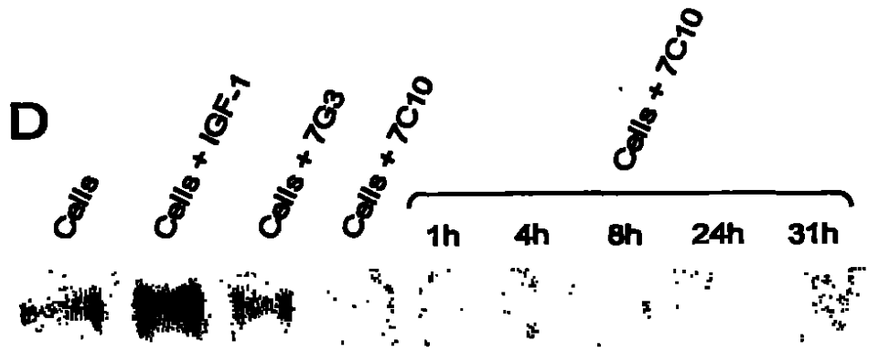


FIGURE 57D

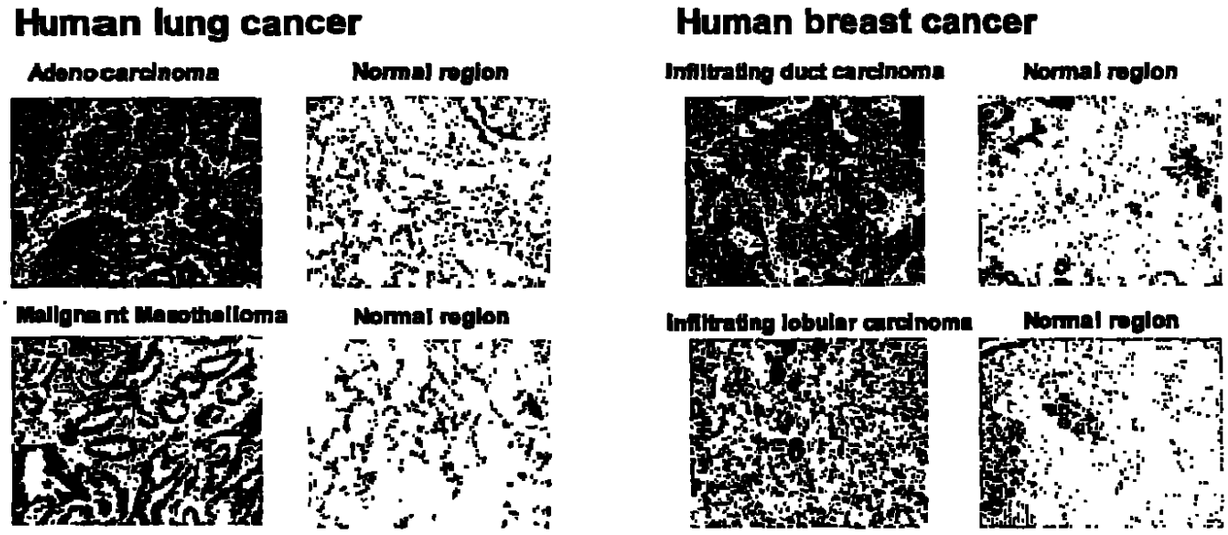


FIGURE 58

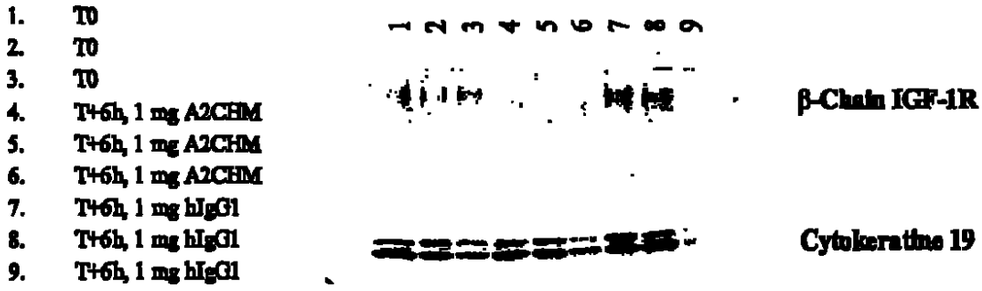


FIGURE 59

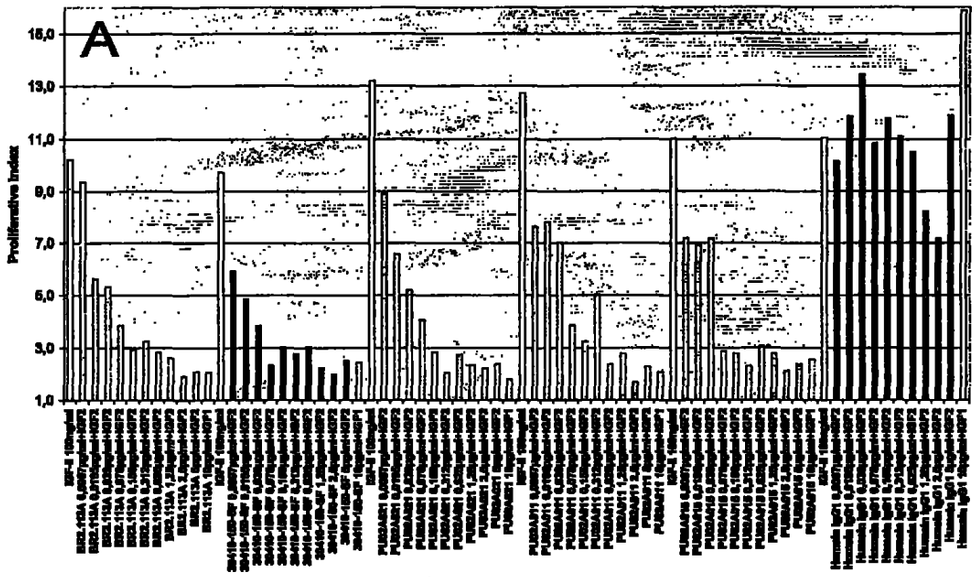


FIGURE 60A

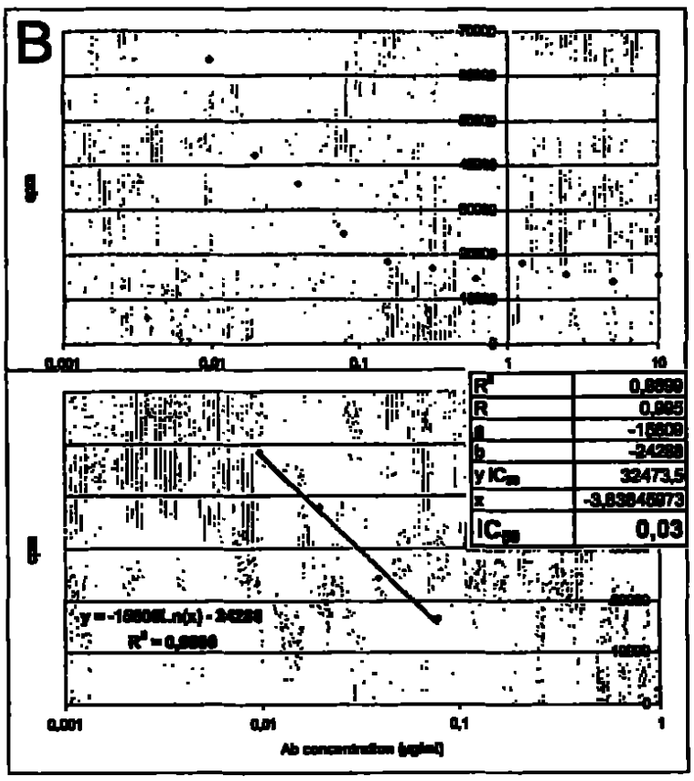


FIGURE 60B

C

Batch number	IC_{50} values (µg/ml (nM)
#30410-150-SF	0.03 (0.20)
#BR2.113A	0.04 (0.27)
#PU02A021	0.04 (0.27)
#PU02A011	0.05 (0.33)
#PU02A015	0.04 (0.27)

FIGURE 60C

201

SEQUENCE LISTING

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT
GOETSCH, Liliane
CORVAIA, Nathalie
LEGER, Olivier
DUFLOS, Alain
BECK, Alain
HAEUW, Jean-François

<120> NOVEL ANTI-INSULIN/IGF-I HYBRID RECEPTOR OR ANTI-INSULIN/IGF-I HYBRID RECEPTOR AND IGF-IR ANTIBODIES AND USES THEREOF

<130> D19919

<150> US 10/735,916
<151> 2003-12-16

<160> 156

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 48
<212> DNA
<213> Mus musculus

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

<400> 1
aga tct agt cag agc att gta cat agt aat gga aac acc tat tta caa 48
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln
1 5 10 15

<210> 2
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 2
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln
1 5 10 15

<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> Mus musculus

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

<400> 3
aaa gtt tcc aac cga ctt tat 21
Lys Val Ser Asn Arg Leu Tyr
1 5

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4
Lys Val Ser Asn Arg Leu Tyr
1 5

<210> 5
<211> 27
<212> DNA
<213> Mus musculus

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

<400> 5
ttt caa ggt tca cat gtt ccg tgg acg 27
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(18)

<400> 7
ggt ggt tat tta tgg aac 18
Gly Gly Tyr Leu Trp Asn
1 5

<210> 8
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 8
Gly Gly Tyr Leu Trp Asn
1 5

<210> 9
<211> 48
<212> DNA
<213> Mus musculus

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

<400> 9
tac ata agc tac gac ggt acc aat aac tac aaa cca tct ctc aaa gat 48
Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Asp
1 5 10 15

<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 10
Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Asp
1 5 10 15

<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(24)

<400> 11
tac ggt agg gtc ttc ttt gac tac 24
Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr
1 5

<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 12
Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr
1 5

<210> 13
<211> 26
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 13
atgaaatgca gctgggtcat sttctt 26

<210> 14
<211> 26

<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 14
atgggatgga gctrtatcat sytctt 26

<210> 15
<211> 26
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 15
atgaagwtgt ggttaaactg ggtttt 26

<210> 16
<211> 23
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 16
atgractttg ggytcagctt grt 23

<210> 17
<211> 26
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 17
atggactcca ggctcaattt agtttt 26

<210> 18
<211> 26
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 18
atggctgtcy trgsgctrct cttctg 26

<210> 19
<211> 26
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 19
atggratgga gckggrtctt tmtctt 26

<210> 20
<211> 23
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 20
atgagagtgc tgattctttt gtg 23

<210> 21
<211> 26
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 21
atggmttggg tgtggamctt gctatt 26

<210> 22
<211> 26
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 22
atgggcagac ttacattctc attcct 26

<210> 23
<211> 28
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 23
atggattttg ggctgatttt ttttattg 28

<210> 24
<211> 26
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 24
atgatggtgt taagtcttct gtacct 26

<210> 25
<211> 29
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 25
atgaagttgc ctgttaggct gttggtgct 29

<210> 26
<211> 29
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 26
atggagwcag acacactcct gytatgggt 29

<210> 27
<211> 23
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 27
atgagtgtgc tcactcaggt cct 23

<210> 28
<211> 26
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 28
atgaggrccc ctgctcagwt tyttgg 26

<210> 29
<211> 29
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 29
atggatttwc aggtgcagat twtcagctt 29

<210> 30
<211> 29
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 30
atggatttwc argtgcagat twtcagctt 29

<210> 31
<211> 26
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 31
atgaggtkcy ytgytsagyt yctgrg 26

<210> 32
<211> 23
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 32
atgggcwtca agatggagtc aca 23

<210> 33
<211> 29
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 33
atgtggggay ctktttycmm tttttcaat 29

<210> 34
<211> 24
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 34
atggtrtccw casctcagtt cctt 24

<210> 35
<211> 26
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 35
atgtatatat gtttgttgtc tatttc 26

<210> 36
<211> 26
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 36
atggaagccc cagctcagct tctctt 26

<210> 37
<211> 26
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 37
atgragtywc agacccaggt cttyrt 26

<210> 38
<211> 26
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 38
atggagacac attctcaggt ctttgt 26

<210> 39
<211> 26
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 39
atggattcac aggcccaggt tcttat 26

<210> 40
<211> 20
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 40
actggatggt gggaagatgg 20

<210> 41
<211> 42
<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(42)

<400> 41
gct gat gct gca cca act gta tcc atc ttc cca cca tcc agt 42
Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10

<210> 42
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 42
Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10

<210> 43
<211> 20
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 43
ccatcttccc accatccagt 20

<210> 44
<211> 18
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 44
ccagtggata gacagatg 18

<210> 45
<211> 33
<212> DNA
<213> Mus musculus

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

<400> 45
gcc aaa acg aca ccc cca tct gtc tat cca ctg 33
Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu
1 5 10

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 46

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

<210> 47
<211> 21
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 47
cccccatctg tctatccact g 21

<210> 48
<211> 438
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (28)..(393)

<400> 48
atgaagttgc ctgttaggct gttggtg ctg atg ttc tgg att cct gct tcc aga 54
Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala Ser Arg
1 5

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

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

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

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

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

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

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

aaa cgg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc ccaccatcca gt 438
Lys

<210> 49
<211> 122

210

<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 49
Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala Ser Arg Ser Asp Val Leu Met Thr Gln
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

<210> 50
<211> 438
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 50
tacttcaacg gacaatccga caaccacgac tacaagacct aaggacgaag gtcttcacta 60
caaaactact gggtttaagg tgagagggac ggacagtcag aacctctagt tcggaggtag 120
agaacgtcta gatcagtctc gtaacatgta tcattacctt tgtggataaa tgttaccatg 180
gacgtctttg gtccagtcag aggtttcgag gactagatgt ttcaaaggtt ggctgaaata 240
ccccagggtc tgtccaagtc accgtcacct agtccctgtc taaagtgtga gttctagtcg 300
tcgcacctcc gactcctaga ccctcaaata atgacgaaag ttccaagtgt acaaggcacc 360
tgcaagccac ctccgtggtt cgacctttag tttgcccgac tacgacgtgg ttgacatagg 420
tagaagggtg gtaggtca 438

<210> 51
<211> 438
<212> DNA
<213> Mus musculus

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

<400> 51
atgatggtgt taagtcttct gtac ctc ttg aca gcc att cct ggt atc ctg 51
Leu Leu Thr Ala Ile Pro Gly Ile Leu
1 5

tct gat gta cag ctt cag gag tca gga cct ggc ctc gtg aaa cct tct 99
Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser

21

```
 10                  15                  20                  25

cag tct ctg tct ctc acc tgc tct gtc acc ggc tac tcc atc acc ggt   147
Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Gly
                30                  35                  40

ggt tat tta tgg aac tgg atc cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg gag   195
Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu
            45                  50                  55

tgg atg ggc tac ata agc tac gac ggt acc aat aac tac aaa cca tct   243

Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser
        60                  65                  70

ctc aaa gat cga atc tcc atc act cgt gac aca tct aag aac cag ttt   291
Leu Lys Asp Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
    75                  80                  85

ttc ctg aag ttg aat tct gtg act aat gaa gac aca gct aca tat tac   339
Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
90                  95                  100                 105

tgt gca aga tac ggt agg gtc ttc ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc   387
Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
                110                 115                 120

act ctc aca gtc tcc tca gccaaaacga caccccatc tgtctatcca ctg       438
Thr Leu Thr Val Ser Ser
            125
```

<210> 52
<211> 127
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 52

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

Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys
            20                  25                  30

Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Gly Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile
        35                  40                  45

Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr
    50                  55                  60

Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Asp Arg Ile Ser Ile
65                  70                  75                  80

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

Thr Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val
            100                 105                 110

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

212

<210> 53
<211> 438
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 53
tactaccaca attcagaaga catggacaac tgtcggtaag gaccatagga cagactacat 60
gtcgaagtcc tcagtcctgg accggagcac tttggaagag tcagagacag agagtggacg 120
agacagtggc cgatgaggta gtggccacca ataaatacct tgacctaggc cgtcaaaggt 180
cctttgtttg acctcaccta cccgatgtat tcgatgctgc catggttatt gatgtttggt 240
agagagtttc tagcttagag gtagtgagca ctgtgtagat tcttggtcaa aaaggacttc 300
aacttaagac actgattact tctgtgtcga tgtataatga cacgttctat gccatcccag 360
aagaaactga tgaccccggt tccgtggtga gagtgtcaga ggagtcggtt ttgctgtggg 420
ggtagacaga taggtgac 438

<210> 54
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 54
Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 55
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 55
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

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

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

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

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

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys
100 105 110

<210> 56
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 56
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 57
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 57
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

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

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

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

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 58
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 59
<211> 100
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Leu Gln Thr Pro

100

<210> 60
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> (35)..(36)
<223> XAA is any of the amino acid

<220>
<221> VARIANT
<222> (39)
<223> XAA is any of the amino acid

<220>
<221> VARIANT
<222> (99)
<223> XAA is any of the amino acid

<400> 60
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 61
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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


<210> 62
<211> 433
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (22)..(414)

<400> 62
gtcagaacgc gtgccgccac c atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg   51
                       Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu
                         1               5                  10

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

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

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

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

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

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

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

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


<210> 63
```

<211> 131
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Phe Pro Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ile Lys
130

<210> 64
<211> 433
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 64
cagtcttgcg cacggcggtg gtacttcaac ggacaatccg acaaccacga ctacaagacc 60
aaaggacgaa ggtcgtcact acaacactac tgagtcagag gtgagaggga cgggcagtgg 120
ggacctctcg gccggaggta gaggacgtcc agatcagtct cgtaacatgt atcattacct 180
ttgtggataa acgttaccat ggacgtcttc ggtcccgtca gaggtgtcga ggactagata 240
tttcaaagat tagccgaaat accccaggga ctgtccaagt caccgtcacc tagtccgtgt 300
ctaaaatgtg acttttagtc gtctcacctc cgactcctac aaccccaaat aatgacgaaa 360
gttccaagtg tacaaggcac ctgcaagccg gttccctggt tccaccttta gtttgcactc 420
acctaggaga cgc 433

<210> 65
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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


<210> 66
<211> 433
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (22)..(414)

<400> 66
gtcagaacgc gtgccgccac c atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg   51
                       Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu
                         1               5                  10

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 67
<211> 131
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Phe Pro Ala
1 5 10 15

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

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile

35 40 45

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

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

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

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

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

Glu Ile Lys
130

<210> 68
<211> 433
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 68
cagtcttgcg cacggcggtg gtacttcaac ggacaatccg acaaccacga ctacaagacc 60
aaaggacgaa ggtcgtcact acaacactac tgagtcagag gtgagaggga cgggcagtgg 120
ggacctctcg gccggaggta gaggacgtcc agatcagtct cgtaacatgt atcattacct 180
ttgtggataa acgttaccat ggacgtcttc ggtcccgtca gaggtgtcga ggactagata 240
tttcaaagat tagccgaaat accccaggga ctgtccaagt caccgtcacc tagtccgtgt 300
ctaaaatgtg acttttagtc gtctcacctc cgactcctac aaccccaaat aatgacgaaa 360
gttccaagtg tacaaggcac ctgcaagccg gttccctggt tccaccttta gtttgcactc 420
acctaggaga cgc 433

<210> 69
<211> 117
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 69
Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 70
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 70
Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 71
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 71
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 72
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 72
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

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

Ile Gly Arg Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Xaa Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 73
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 73

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 74
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 74
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg

<210> 75
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 76
<211> 445
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (22)..(426)

<400> 76

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

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

cca gga ctg gtg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc   147
Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val
            30                  35                  40

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

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

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

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

gcg gac act gca gtg tat tac tgt gcg aga tac ggt agg gtc ttc ttt   387
```

224

224

```
Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe
            110                 115                 120

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

tcctctgcg                                                        445


<210> 77
<211> 135
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77
Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu Thr Ala Ile Pro Gly Ile
  1               5                  10                  15

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    130


<210> 78
<211> 445
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 78
cagtcttgcg cacggcggtg gtactttcac aactcagaca acatggagaa ctgtcggtaa 60
ggaccatagg acagagtcca cgtcgaagtc ctcagcccgg gtcctgacca cttcggaagc 120
ctctgggaca gggagtggac gtgacagaga ccaatgaggt agtggccacc aataaatacc 180
ttgacctatg ccgtcggggg tcccttccct gacctcacct accccatata gtcgatgctg 240
ccatggttat tgatgtttgg gagggagttc ctagcttagt ggtatagtgc actgtgcagg 300
ttcttggtca agagggactt cgactcgaga cactggcgac gcctgtgacg tcacataatg 360
acacgctcta tgccatccca gaagaaactg atgaccccgg tcccttggga ccagtggcag 420
aggagtccac tcacctagga gacgc                                       445


<210> 79
```

<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 79
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 80
<211> 445
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (22)..(426)

<400> 80
gtcagaacgc gtgccgccac c atg aaa gtg ttg agt ctg ttg tac ctc ttg 51
Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu
1 5 10

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

cca gga ctg gtg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc 147
Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val
30 35 40

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

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

226
226

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

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

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

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

tcctctgcg                                                        445
```

<210> 81
<211> 135
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 81

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    130
```

<210> 82
<211> 445
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 82

```
cagtcttgcg cacggcggtg gtactttcac aactcagaca acatggagaa ctgtcggtaa 60
ggaccatagg acagagtcca cgtcgaagtc ctcagcccgg gtcctgacca cttcggaagc 120
```

ctctgggaca gggagtggac gtgacagaga ccaatgaggt agtcgccacc aataaatacc 180
ttgacctatg ccgtcggggg tcccttccct gacctcacct agcccatata gtcgatgctg 240
ccatggttat tgatgtttgg gagggagttc ctagctcagt ggtatagtgc actgtgcagg 300
ttcttggtca agagggactt cgactcgaga cactggcgac gcctgtgacg tcacataatg 360
acacgctcta tgccatccca gaagaaactg atgaccccgg tcccttggga ccagtggcag 420
aggagtccac tcacctagga gacgc 445

<210> 83
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 83
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 84
<211> 445
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (22)..(426)

<400> 84
gtcagaacgc gtgccgccac c atg aaa gtg ttg agt ctg ttg tac ctc ttg 51
Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu
1 5 10

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

cca gga ctg gtg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc 147
Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val
30 35 40

778

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

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

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

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

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

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

tcctctgcg                                                       445
```

<210> 85
<211> 135
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 85

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    130
```

<210> 86
<211> 445
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 86
cagtcttgcg cacggcggtg gtactttcac aactcagaca acatggagaa ctgtcggtaa 60
ggaccatagg acagagtcca cgtcgaagtc ctcagcccgg gtcctgacca cttcggaagc 120
ctctgggaca gggagtggac gtgacagaga ccaatgaggt agtcgccacc aataaatacc 180
ttgacctatg ccgtcggggg tcccttccct gacctcacct agcccatata gtcgatgctg 240
ccatggttat tgatgtttgg gagggagttc ctagctcagt ggtatagtca cctgtgcagg 300
ttcttggtca agagggactt cgactcgaga cactggcgac gcctgtgacg tcacataatg 360
acacgctcta tgccatccca gaagaaactg atgaccccgg tcccttggga ccagtggcag 420
aggagtccac tcacctagga gacgc 445

<210> 87
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description de la Artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 87
gtcagaacgc gtgccgcc 18

<210> 88
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 88
accatgaagt tgcctgttag gctgttggtg ct 32

<210> 89
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 89
gatgttctgg tttcctgctt ccagcagtga tg 32

<210> 90
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>

230

<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 90
ttgtgatgac tcagtctcca ctctccctgc cc 32

<210> 91
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 91
gtcacccctg gagagccggc ctccatctcc tg 32

<210> 92
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 92
caggtctagt cagaccatta tacatagtaa tg 32

<210> 93
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 93
gaaacaccta tttggaatgg tacctgcaga 30

<210> 94
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 94
ggcaacttca tggtggcggc acgcgttctg ac 32

<210> 95
<211> 32

<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 95
gaaaccagaa catcagcacc aacagcctaa ca 32

<210> 96
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 96
ctgagtcatc acaacatcac tgctggaagc ag 32

<210> 97
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 97
tctccagggg tgacgggcag ggagagtgga ga 32

<210> 98
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 98
tctgactaga cctgcaggag atggaggccg gc 32

<210> 99
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 99
aaataggtgt ttccattact atgtacaatg c 31

<210> 100
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 100
cagggcagtc tccacagctc ctgatctata aa 32

<210> 101
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 101
gtttctaatc ggctttatgg ggtccctgac ag 32

<210> 102
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 102
gttcagtggc agtggatcag gcacagattt ta 32

<210> 103
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 103
cactgaaaat cagcagagtg gaggctgagg at 32

<210> 104
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:

233
237

Oligonucleotide

<400> 104
gttggggttt attactgctt tcaaggttca ca 32

<210> 105
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 105
tgttccgtgg acgttcggcc aagggaccaa gg 32

<210> 106
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 106
tggaaatcaa acgtgagtgg atcctctgcg 30

<210> 107
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 107
tctgcaggta ccattgc 17

<210> 108
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 108
tgcaatggta cctgcagaag c 21

<210> 109
<211> 32
<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 109
agactgccct ggcttctgca ggtaccattg ca 32

<210> 110
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 110
cgattagaaa ctttatagat caggagctgt gg 32

<210> 111
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 111
tgccactgaa cctgtcaggg accccataaa gc 32

<210> 112
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 112
gattttcagt gtaaaatctg tgcctgatcc ac 32

<210> 113
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 113
taaaccccaa catcctcagc ctccactctg ct 32

<210> 114
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 114
tccacggaac atgtgaacct tgaaagcagt aa 32

<210> 115
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 115
tttgatttcc accttggtcc cttggccgaa c 31

<210> 116
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 116
cgcagaggat ccactcacg 19

<210> 117
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 117
gtcagaacgc gtgccgcc 18

<210> 118
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 118
accatgaaag tgttgagtct gttgtacctc ttga 34

<210> 119
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 119
cagccattcc tggtatcctg tctcaggtgc agct 34

<210> 120
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 120
tcaggagtcg ggcccaggac tggtgaagcc ttcg 34

<210> 121
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 121
gagaccctgt ccctcacctg cactgtctct ggt 33

<210> 122
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 122
tactccatca ccggtggtta tttatggaac tgg 33

<210> 123
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 123
atacggcagc ccccagggaa gggactggag tgg 33

<210> 124
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 124
atggggtata tcagctacga cggtaccaat aac 33

<210> 125
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 125
tcaacacttt catggtggcg gcacgcgttc tgac 34

<210> 126
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 126
ataccaggaa tggctgtcaa gaggtacaac agac 34

<210> 127
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 127
tgggcccgac tcctgaagct gcacctgaga cagg 34

<210> 128
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 128
tgagggacag ggtctccgaa ggcttcacca gtcc 34

<210> 129
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 129
ccaccggtga tggagtaacc agagacagtg cagg 34

<210> 130
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 130
ccctgggggc tgccgtatcc agttccataa ataa 34

<210> 131
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 131
tagctgatat accccatcca ctccagtccc tt 32

<210> 132
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 132
gttattggta ccgtcg 16

<210> 133
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 133
tacgacggta ccaataacta c 21

<210> 134
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 134
aaaccctccc tcaaggatcg aatcaccata tc 32

<210> 135
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 135
acgtgacacg tccaagaacc agttctccct ga 32

<210> 136
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 136
agctgagctc tgtgaccgct gcggacactg ca 32

<210> 137
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 137
gtgtattact gtgcgagata cggtagggtc tt 32

<210> 138
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 138
ctttgactac tggggccagg gaaccctggt ca 32

<210> 139
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 139
ccgtctcctc aggtgagtgg atcctctgcg 30

<210> 140
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 140
agggagggtt tgtagttatt ggtaccgtcg ta 32

<210> 141
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 141
acgtgtcacg tgatatggtg attcgatcct tg 32

<210> 142

<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 142
agagctcagc ttcagggaga actggttctt gg 32

<210> 143
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 143
cagtaataca ctgcagtgtc cgcagcggtc ac 32

<210> 144
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 144
agtagtcaaa gaagacccta ccgtatctcg ca 32

<210> 145
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 145
ctgaggagac ggtgaccagg gttccctggc ccc 33

<210> 146
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description of artificial sequence:
Oligonucleotide

<400> 146

cgcagaggat ccactcac 18

<210> 147
<211> 31
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 147
ctggttactc catcagcggt ggttatttat g 31

<210> 148
<211> 31
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 148
cataaataac caccgctgat ggagtaacca g 31

<210> 149
<211> 31
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 149
gggactggag tggatcgggt atatcagcta c 31

<210> 150
<211> 31
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 150
gtagctgata tacccgatcc actccagtcc c 31

<210> 151
<211> 31
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 151
tccctcaagg atcgagtcac catatcacgt g 31

<210> 152
<211> 31
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 152
cacgtgatat ggtgactcga tccttgaggg a 31

<210> 153
<211> 39
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 153
gatcgagtca ccatatcagt ggacacgtcc aagaaccag 39

<210> 154
<211> 39
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 154
ctggttcttg gacgtgtcca ctgatatggt gactcgatc 39

<210> 155
<211> 31
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 155
gcttccagca gtgatattgt gatgactcag t 31

<210> 156
<211> 31
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 156
actgagtcat cacaatatca ctgctggaag c 31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/IB2004/004360 244 24A

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K16/28 A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/059951 A (PIERRE FABRE MEDICAMENT; GOETSCH, LILIANE; CORVAIA, NATHALIE; LEGER, O) 24 July 2003 (2003-07-24) the whole document	1-78
P,X	ZHANG H ET AL: "THE THERAPEUTIC POTENTIAL OF AGENTS TARGETING THE TYPE I INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR RECEPTOR" EXPERT OPINION ON INVESTIGATIONAL DRUGS, ASHLEY PUBLICATIONS LTD., LONDON, GB, vol. 13, no. 12, December 2004 (2004-12), pages 1569-1577, XP008048792 ISSN: 1354-3784 page 1572, left-hand column, last paragraph	1-78

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 July 2005	28/07/2005

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Mata Vicente, T.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MALONEY E K ET AL: "An anti-insulin-like growth factor I receptor antibody that is a potent inhibitor of cancer cell proliferation" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 63, no. 16, 15 August 2003 (2003-08-15), pages 5073-5083, XP002978956 ISSN: 0008-5472 abstract	1-78

Continuation of Box II.1

Although as far as an "in vivo" method is concerned claims 61-66 are directed to a method of treatment practised on the human/animal body and the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: -

Present claim 32 relates to an extremely large number of possible compounds ("second compound chosen from the compounds capable of specifically inhibiting the binding of the EGF"). Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the anti-EGFR antibodies mentioned in claim 36.

Present claims 71 and 72 relate to an extremely large number of possible compounds ("detectable probe that is specific for..."). Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the compounds claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to an antibody, as mentioned in claim 73.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/IB2004/004360

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although as far as an "in vivo" method is concerned claims 61-66 are directed to a method of treatment practised on the human/animal body and the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. [X] Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03059951 A	24-07-2003	FR 2834990 A1	25-07-2003
		FR 2834900 A1	25-07-2003
		FR 2834991 A1	25-07-2003
		AU 2003216748 A1	30-07-2003
		BR 0306973 A	09-11-2004
		CA 2473039 A1	24-07-2003
		EP 1461359 A2	29-09-2004
		WO 03059951 A2	24-07-2003
		US 2005084906 A1	21-04-2005
		ZA 200405402 A	20-01-2005

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

(43) Fecha de Publicación Internacional
30 de junio de 2005 (30.06.2005)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2005/058967 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes[7]: C07K 16/28, A61K 39/395

(21) No. Solicitud Internacional: PCT/IB2004/004360

(22) Fecha de Presentación Internacional: 16 de diciembre de 2004 (16.12.2004)

(25) Idioma de Presentación: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Datos relativos a la Prioridad: 10/735,916 16 de diciembre de 2003 (16.12.2003) US

(71) Solicitante *(para todos los países destinatarios con excepción de US)*: PIERRE FABRE MEDICAMENT [FR/FR]; 45, place bel-Gance, F-92100 Boulogne Billancourt (FR).

(72) Inventores, e
(75) Inventores/Solicitantes *(para US únicamente)*: GOETSCH, Liliane [FR/FR]; 15, route de Cluses, F-74130 Ayze (FR). CORVAIA, Nathalie [FR/FR]; Résidence Les Chênes, 2, rue des Chênes, F-74160 Archamps (FR). DUFLOS, Alain [FR/FR]; 7, rue Emile-Caraguel, F-81290 Labruguière (FR). HAEUW, Jean-François [FR/FR]; La Rose-des-Vents, 2, place de la Libération, F-74160 Saint-Julien-en-Genevois (FR). LEGER, Olivier [FR/FR]; 22, rue Marc Courriard, F-74100 Annemasse (FR). BECK, Alain [FR/FR]; 503, route du Poirier à l'Ane, F-74160 Collonges sous Salève (FR).

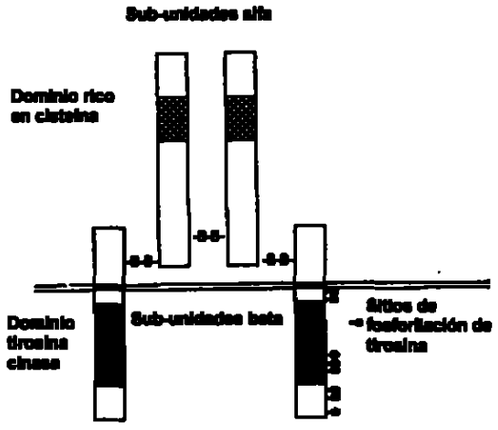
(74) Agentes: MARTIN, Jean-Jacques; Cabinet Regimbeau, 20, rue de Chazelles, Cedex 17, F-75847 Paris (FR).

(81) Países designados *(a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Países designados *(a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continúa en la página siguiente]

(54) Título: NOVEDOSOS ANTICUERPOS DE RECEPTOR HÍBRIDO ANTI-INSULINA/IGF-I O DE RECEPTOR HÍBRIDO ANTI-INSULINA/IGF-I E IGF-IR Y SUS USOS



(57) Extracto: La presente invención se relaciona con anticuerpos capaces de unirse específicamente a I) el receptor híbrido (R-híbrido) anti-insulina/IGF-I humano o II) tanto a dicho R-híbrido como al receptor del factor de crecimiento insulinoide tipo I humano (IGF-IR) y/o capaces de inhibir específicamente la actividad tirosina cinasa de dichos R-híbrido o ambos R-híbrido e IGF-IR, especialmente anticuerpos monoclonales de origen murino, quimérico y humanizado, así como las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos que codifican para estos anticuerpos. Igualmente la invención comprende el uso de estos anticuerpos como un medicamento para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de neoplasias malignas que sobre-expresan, o con una activación anormal de, R-híbrido o ambos R-híbrido e IGF-IR, o cualquier patología asociada con la sobre-expresión, o activación anormal, de dicho receptor, así como en procesos o kits para el diagnóstico de enfermedades asociadas con la sobre-expresión del R-híbrido o ambos R-híbrido e IGF-IR. Finalmente, la invención comprende productos y/o composiciones que contienen tales anticuerpos en combinación con anticuerpos anti-EGFR y/o compuestos y/o agentes anti-cancerosos o agentes conjugados con toxinas y su uso para la prevención y/o el tratamiento de ciertas neoplasias malignas.

WO 2005/058967 A3

Declaraciones bajo la Regla 4.17:

— *en cuanto al derecho del solicitante de solicitar y que se le conceda una patente (Regla 4.17(ii)) para las siguientes designaciones AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW, patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)*

— *con respecto al derecho del solicitante a reivindicar la prioridad de la solicitud anterior (Regla 4.17(iii))para todas las designaciones*

— *de la condición de inventor (Regla 4.17(iv)) para los USA únicamente*

Publicado:

— *sin informe internacional de búsqueda*

(48) Fecha de publicación de esta versión corregida:

23 de marzo de 2006

(15) Información acerca de la Corrección

Véase Gaceta PCT No. 34/2005 del 25 de agosto de 2005, Sección II

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, remítase a las "Notas Guía sobre Códigos y Abreviaturas" que aparece al comienzo de cada edición regular del Boletín Oficial PCT.

NOVEDOSOS ANTICUERPOS DE RECEPTOR HÍBRIDO ANTI-INSULINA/IGF-I O DE RECEPTOR HÍBRIDO ANTI-INSULINA/IGF-I E IGF-IR Y SUS USOS

La presente invención se refiere a anticuerpos novedosos capaces de unirse específicamente a i) el receptor híbrido insulina/IGF-I humano, isoforma(s) A y/o B, (denominadas a partir de ahora "R-híbrido" o, a veces, "Rs-híbrido", "RsA-híbrido" para la isoforma A o "RsB-híbrido" para la isoforma B) y/o ii) ambos, el receptor R-híbrido y el receptor del factor de crecimiento insulinoide tipo I (denominado a partir de ahora "IGF-IR") y/o capaces de inhibir específicamente la actividad tirosina cinasa de dicho R-híbrido o ambos, el R-híbrido e IGF-IR, especialmente anticuerpos monoclonales de origen murino, quimérico y humanizado, así como las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos que codifican para estos anticuerpos. La invención comprende asimismo el empleo de estos anticuerpos como un medicamento para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de neoplasias malignas que sobre-expresan, o con una activación anormal de, R-híbrido o ambos, R-híbrido e IGF-IR o cualquier patología conectada con la sobre-expresión, o una activación anormal, de dicho receptor(es), así como en procesos o kits para el diagnóstico de enfermedades conectadas con la sobre-expresión, o una activación anormal, del R-híbrido o ambos, el R-híbrido e IGF-IR. Finalmente, la invención comprende productos y/o composiciones que abarcan tales anticuerpos en combinación con anticuerpos anti-EGFR y/o compuestos y/o agentes anti-cancerosos o agentes conjugados con toxinas y su empleo para la prevención y/o el tratamiento de ciertas neoplasias malignas.

El receptor del factor de crecimiento insulinoide tipo I, denominado IGF-IR, es un receptor con actividad tirosina cinasa que posee 70% de homología con el receptor de insulina (denominado a partir de ahora "IR"). La secuencia(s) que codifica(n) para el IGF-IR están registrados bajo el Número de Acceso NM_000875 en el NCBI Genbank. Otros datos, sin

252

limitación e incorporados aquí por referencia, que describen secuencia (s) IGF-IR es Ulrich et al., 1986, EMBO J., 5(10):2503-2512. El IGF-IR es una glicoproteína de peso molecular de aproximadamente 350.000. Es un receptor hetero-tetramérico cuya cada mitad – enlazada por puentes disulfuro – se compone de una subunidad α extracelular y de una subunidad β transmembrana (ver Figura 1). IGF-IR une sus ligandos nativos, preferiblemente IGF1 e IGF2, con una afinidad muy alta (Kd #1 nM), pero es igualmente capaz de unirse a insulina con una afinidad 100 a 1.000 veces menor. Inversamente, el IR une insulina con una afinidad muy alta, aunque los IGFs sólo se unen al IR con una afinidad 100 veces menor. El dominio tirosina cinasa de IGF-IR y de IR tiene una altísima homología de secuencia, aunque las zonas de homología más débil, respectivamente, conciernen a la región rica en cisteína, situada en la subunidad α y la parte C-terminal de la subunidad β. Las diferencias de secuencia observadas en la subunidad α están situadas en la zona de unión de los ligandos y, por lo tanto, están en el origen de las afinidades relativas de IGF-IR y de IR para los IGFs y la insulina respectivamente. Las diferencias en la parte C-terminal de la subunidad β resultan en una divergencia en las rutas de señalización de los dos receptores; IGF-IR media los efectos mitógenos, de diferenciación y antiapoptosis, mientras que la activación del IR implica principalmente efectos en el nivel de las rutas metabólicas (Baserga et al., Biochim. Biophys. Acta, 1332:F105-126, 1997; Baserga R., Exp. Cell. Res., 253: 1-6, 1999).

Las proteínas tirosina cinasa citoplásmicas se activan por la unión del ligando al dominio extracelular del receptor. La activación de las cinasas, a su vez, implica la estimulación de diferentes sustratos intracelulares, incluidos IRS-1, IRS- 2, Shc y Grb 10 (Peruzzi F. et al., J. Cancer Res. Clin. Oncol., 125: 166-173, 1999). Los dos sustratos principales de IGF-IR son IRS y Shc que median, por la activación de numerosos efectores corriente abajo, la mayoría de los efectos de crecimiento y diferenciación conectados con la unión de los IGFs a este receptor (Figura 2). En consecuencia, la

disponibilidad de sustratos puede dictar el efecto biológico final conectado con la activación del IGF-IR. Cuando IRS-1 predomina, las células tienden a proliferar y a transformarse. Cuando Shc domina, las células tienden a diferenciarse (Valentinis B. et al., J. Biol. Chem., 274:12423-12430, 1999). Parece que la ruta principalmente involucrada para los efectos de protección contra apoptosis es la ruta de fosfatidil-inositol 3-cinasas (PI 3-cinasas) (Prisco M. et al., Horm. Metab. Res., 31:80-89, 1999; Peruzzi F. et al., J. Cancer Res. Clin. Oncol., 125:166-173,1999).

El papel del sistema IGF en la carcinogénesis se ha convertido en el objeto de una investigación intensiva en los últimos diez años. Este interés, seguido por el descubrimiento del hecho que, aparte de sus propiedades mitógenas y antiapoptosis, parece que el IGF-IR se requiere para el establecimiento y el mantenimiento de un fenotipo transformado. De hecho, se ha establecido perfectamente que una sobre-expresión o una activación constitutiva de IGF-IR lleva, en una gran variedad de células, a un crecimiento de las células independiente del soporte en un medio desprovisto de suero bovino fetal, y a la formación de tumores en ratones inmunitariamente desprotegidos (***"nude mice"***). Ésta no es en sí misma una propiedad única puesto que una gran variedad de productos de genes sobre-expresados pueden transformar células, incluido un gran número de receptores de factores de crecimiento. No obstante, el crucial descubrimiento que ha demostrado claramente el papel principal ejercido por IGF-IR en la transformación ha sido la demostración de que las células R, en las cuales se ha inactivado el gen que codifica para IGF-IR, son totalmente refractarias a transformación por diferentes agentes, los cuales son usualmente capaces de transformar las células, tales como la proteína E5 del virus del papiloma bovino, una sobre-expresión de EGFR o de PDGFR, el antígeno T de SV 40, ras activado o la combinación de estos dos factores (Sell C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90: 11217-11221, 1993; Sell C. et al., Mol. Cell. Biol., 14:3604-3612, 1994; Morrione A. J., Virol.,

69:5300-5303, 1995; Coppola D. et al., Mol. Cell. Biol., 14:4588-4595, 1994; DeAngelis T et al., J. Cell. Physiol., 164:214-221, 1995).

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

Por primera vez, datos que ilustran el reconocimiento de R-híbrido o ambos, R-híbrido e IGF-IR por el mismo anticuerpo monoclonal capaz de inhibir específicamente, *in vitro* e *in vivo*, el crecimiento tumoral, permitiendo en esa forma tratar el cáncer, más particularmente el cáncer de mama, capaz de expresar conjuntamente los dos tipos de receptor se muestran en el presente ejemplo (ver particularmente ejemplo 26). Actualmente, la capacidad de 7C10 y h7C10 de reconocer y/o inhibir la actividad tirosina cinasa de R-híbrido o ambos, el R-híbrido e IGF-IR permite evitar el escape del tumor consecuente con la expresión, o la activación anormal, de este R-híbrido. Tal anticuerpo podría ser un compuesto terapéutico innovador de interés esencial para el tratamiento del cáncer.

Las patologías cancerosas se caracterizan por un crecimiento celular incontrolado. En varios tipos de cáncer, los factores de crecimiento se unen

específicamente a sus receptores y luego transmiten señales de crecimiento, transformación y/o supervivencia a la célula tumoral. La sobre-expresión de receptores de factor de crecimiento en la superficie de la célula tumoral se describe ampliamente (Salomon DS et al., Crit. Rev. Oncol. Hematol., 1995, 19:183; Burrow S. et al., J. Surg. Oncol., 1998,69: 21; Hakam A. et al., Hum. Pathol., 1999, 30:1128; Railo M.J. et al., Eur. J. Cancer, 1994, 30:307; Happerfield L.C. et al., J. Pathol., 1997, 183:412). Esta sobre-expresión, o activación anormal, que lleva a una perturbación directa de los mecanismos de regulación del crecimiento celular, puede afectar igualmente la sensibilidad de la célula a una apoptosis inducida por quimioterapias o radioterapias clásicas.

Durante los últimos años, se ha demostrado que el reconocimiento (***"targeting"***) de receptores de factores de crecimiento, como EGFR o Her2/neu sobre-expresados en la superficie de la célula tumoral, con anticuerpos respectivamente humanizados (herceptin®) o quiméricos (C225) resulta en una inhibición significativa del crecimiento tumoral en pacientes y en un incremento significativo de la eficacia de tratamientos de quimioterapia clásica (Carter P., Nature Rev. Cancer, 2001, 1(2):118; Hortobagyi G. N., Semin. Oncol., 2001, 28:43; Herbst R.S. et al., Semin. Oncol., 2202, 29:27). Otros receptores como IGF-IR o VEGF-R (receptor de factor de crecimiento endotelial vascular) se han identificado como diana potencial en varios estudios preclínicos.

Más particularmente, IGF-IR es parte de los receptores de tirosina cinasa. Éste muestra una alta homología con el receptor de insulina (IR) que existe bajo dos isoformas A y B. Secuencias de IR, isoformas A y B, se encuentran registradas bajo los Números de Acceso X02160 y M10051, respectivamente, en el NCBI Genbank. Otros datos, sin limitaciones, relacionados con IR se incorporan aquí por referencias (Vinten et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:249-252; Belfiore et al., 2002, The Journal of Biological Chemistry, 277: 39684-39695; Dumesic et al., 2004, The Journal of Endocrinology & Metabolism, 89(7):3561-3566).

El IGF-IR e IR son glicoproteínas tetraméricas compuestas de dos subunidades α extracelulares y dos subunidades β transmembrana conectadas por enlaces disulfuro. Cada subunidad α, que contiene el sitio de unión de ligando, es aproximadamente 130- a 135-kDa, mientras que cada subunidad β, que contiene el dominio tirosina cinasa, es aproximadamente 90- a 95- kDa. Estos receptores comparten más del 50% de similitud general de secuencia de aminoácidos y 84% de similitud en el dominio tirosina cinasa. Luego de la unión del ligando, los receptores fosforilados reclutan y fosforilan proteínas de fijación (***"docking proteins"***), incluida la familia de proteínas de sustrato 1 de receptor de insulina (IRS1), Gab1 y Shc (Avruch, 1998, Mol. Cell. Biochem., 182:31-48; Roth et al., 1988, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 53: 537-543; White, 1998, Mol. Cell. Biochem., 182:3-11; Laviola et al., 1997, J. Clin. Invest., 99:830-837; Cheatham et al., 1995, Endocr. Rev., 16:117-142), que llevan a la activación de diferentes mediadores intracelulares. Aunque ambos, el IR e IGF-IR activan del mismo modo rutas principales de señalización, existen diferencias en el reclutamiento de ciertas proteínas de fijación y mediadores intracelulares entre los dos receptores (Sasaoka et al., 1996, Endocrinology 137: 4427-4434; Nakae et al., 2001, Endocr. Rev., 22:818-835; Dupont and Le Roith, 2001, Horm. Res., 55, Suppl. 2:22-26; Koval et al., 1998, Biochem. J., 330:923-932). Estas diferencias constituyen la base de los efectos metabólicos predominantes producidos como respuesta por la activación de IR y los efectos mitógenos, transformadores y anti-apoptóticos predominantes, producidos como respuesta por la activación de IGF-IR (De Meyts et al., 1995, Ann. N.Y. Acad. Sci., 766:388- 401; Singh et al., 2000, Prisco et al., 1999, Horm. Metab. Res., 31:80-89; Kido et al., 2001, J. Clin. Endocrinol. Metab., 86:972-979). La insulina se une con alta afinidad al IR (100 veces más que al IGF-IR), mientras que los factores de crecimiento insulinoides (IGF1 e IGF2) se unen al IGF-IR con una afinidad 100 veces mayor que al IR.

El IR humano existe en dos isoformas, IR-A e IR-B, generadas por el corte y empalme del gen IR, que o bien excluye o incluye residuos de 12

aminoácidos codificados por un pequeño exón (exón 11) en el terminus carboxi de la subunidad α del IR. La abundancia relativa de isoformas IR se regula por factores desconocidos y específicos de tejidos (Moller et al., 1989, Mol. Endocrinol., 3:1263-1269; Mosthaf et al., 1990, EMBO J., 9:2409-2413). IR-B es la isoforma IR predominante en tejidos adultos normales (tejido adiposo, hepático y muscular) que son importantes tejidos diana para los efectos metabólicos de la insulina (Moller et al., 1989; Mosthaf et al., 1990). IR-A es la isoforma predominante en los tejidos fetales y media el crecimiento fetal en respuesta a IGF2 (Frasca et al., 1999, Mol. Cell. Biol., 19:3278-3288), como se sugiere igualmente por estudios genéticos llevados a cabo en ratones transgénicos (DeChiara et al., 1990, Nature, 345:78-80; Louvi et al., 1997, Dev. Biol., 189:33-48). Por otra parte, cuando las células se transforman y se vuelven malignas, la diferenciación se asocia a menudo con una abundancia relativa IR-A creciente (Pandini et al., 2002, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 277, N° 42, pp39684-39695).

Dado el alto grado de homología, los semi-receptores de insulina e IGF-I (compuestos de una subunidad α y una subunidad β) pueden heterodimerizarse, llevando a la formación de receptores híbridos insulina/IGF-I (R-híbrido) (Soos et al., 1990, Biochem J., 270: 383-390; Kasuya et al., 1993, Biochemistry, 32:13531-13536; Seely et al., 1995, Endocrinology 136:1635-1641; Bailyes et al., 1997, Biochem J., 327:209-215).

Las dos isoformas IR están igualmente en capacidad de formar híbridos con IGF-IR. R-híbridos, sin embargo, poseen diferentes características funcionales. RsB-híbrido posee una afinidad reducida para IGF1 y, especialmente, para IGF2. En contraste, RsA-híbrido posee una alta afinidad para IGF1 y une además IGF2 e insulina en un rango de concentración fisiológica. La expresión de RsA-híbrido regula por incremento el sistema IGF por dos mecanismos diferentes i) unión (con alta afinidad) y activación por los dos IGF1 e IGF2 (lo que no ocurre con el

RsB-híbrido), ii) activación de la ruta IGF-IR luego de la unión de insulina. La unión de insulina a RsA-híbrido fosforila las subunidades β del IGF-IR y activa el sustrato específico de IGF-IR (CrkII), de manera que el RsA-híbrido convierte la insulina en señalización IGF-IR (Pandini et al., 2002).

En varios tejidos, como el hígado, el bazo o la placenta, los R-híbridos están más representados que IGF-IR (Bailyes et al., 1997). Como los tejidos tumorales sobre-expresan, o presentan una activación anormal de, los dos IGF-IR e IR-A (Frasca et al., 1999; Sciacca et al., 1999, Oncogene 18:2471-2479; Vella et al., 2001, Mol. Pathol., 54:121-124), los RsA-híbridos pueden sobre-expresarse igualmente en una variedad de tumores malignos humanos, incluidos el cáncer de tiroides y mama, proporcionándoles una ventaja de crecimiento selectivo a las células malignas, en capacidad de responder, por un tipo de señalización IGF-IR, luego de una estimulación por IGF1 y/o IGF2, pero también por insulina en concentraciones fisiológicas (Bailyes et al., 1997; Pandini et al., 1999, Clin. Cancer Res., 5:1935-1944; Belfiore et al., 1999, Biochimie (Paris) 81:403-407; Frasca et al., 1999; Sciacca et al., 1999; Vella et al., 2001).

La realización de tales "herramientas terapéuticas", capaces de bloquear al mismo tiempo los dos receptores, es de particular interés pues permitirán evitar los fenómenos de escape mediados por la expresión, o activación anormal, en un mismo tumor de R-híbrido o ambos, R-híbrido e IGF-IR.

La presente invención permite bloquear la actividad R-híbrido generando un compuesto y, más particularmente, un anticuerpo, de alta afinidad capaz de unirse a dicho receptor y, además, de bloquear su activación por sus ligandos nativos, preferiblemente IGF1, IGF2 o Insulina.

La presente invención permite asimismo bloquear conjuntamente la actividad del R-híbrido e IGF-IR generando un compuesto y, más particularmente, un anticuerpo, de alta afinidad capaz de unirse a dichos dos

receptores y, además, bloquear su activación, respectivamente, sus ligandos nativos, preferiblemente por IGF1, IGF o Insulina.

La presente invención se ocupa también del uso de un anticuerpo aislado de acuerdo con la presente invención, o su fragmento, estando dicho anticuerpo o fragmento en capacidad de unirse a i) R-híbrido humano, y/o inhibir la unión de sus ligandos nativos, preferiblemente IGF1, IGF2 y/o Insulina, y/o en igual forma en capacidad de inhibir específicamente la actividad tirosina cinasa de dicho R-híbrido, y/o ii) ambos, el R-híbrido humano y el IGF-IR humano, y/o inhibir la unión de sus ligandos nativos, preferiblemente IGF1 y/o IGF2 y/o insulina, y/o igualmente en capacidad de inhibir específicamente la actividad tirosina cinasa de dichos R-híbrido e IGF-IR.

Más particularmente, en una incorporación preferida, dicho anticuerpo se caracteriza porque comprende las secuencias de los anticuerpos 7C10 y h7C10 anti-IGF-IR, y sus fragmentos, de la presente invención, notablemente los anticuerpos anti-IGF-IR de acuerdo con la presente invención con una cadena ligera que comprende por lo menos una región CDR seleccionada del grupo conformado por SEQ ID No. 2, 4 ó 6 (o por lo menos una CDR con por lo menos 80% de homología luego de la alineación óptima con SEQ ID No. 2, 4 ó 6), y/o una cadena pesada que comprende por lo menos una región CDR seleccionada del grupo conformado por SEQ ID No. 8, 10 ó 12 (o por lo menos una CDR con por lo menos 80% de homología luego de la alineación óptima con SEQ ID No. 8, 10 ó 12).

De acuerdo con otra incorporación preferida, dicho anticuerpo se emplea para terapia de cáncer, más particularmente, terapia de cáncer de mama.

Actualmente, se sabe que las células tumorales mamarias presentan específicamente en su superficie IGF-IR, pero también un gran número de receptores de Insulina y, como consecuencia, un gran número de R-híbridos (Frasca et al., 1999; Sciacca et al., 1999; Vella et al., 2001).

El objeto de la presente invención es poder disponer de un anticuerpo monoclonal murino, preferiblemente un anticuerpo humanizado o quimerizado (***"chimerized antibody"***), que reconozca R-híbrido o ambos, R-híbrido e IGF-IR específicamente y con gran afinidad.

Este anticuerpo interactuará en pequeña medida o en absoluto con el IR sobre la insulina. Su unión estará en capacidad de inhibir *in vitro* el crecimiento de tumores que expresan, o con una activación anormal de, R-híbrido o ambos, R-híbrido e IGF-IR interactuando principalmente con las rutas de transducción de señales activadas durante interacciones entre i) R-híbrido con ligandos nativos, preferiblemente IGF1, IGF2 e insulina y/o ii) ambos, R-híbrido e IGF-IR con sus respectivos ligandos nativos, preferiblemente IGF1, IGF2, insulina para R-híbrido e IGF1, IGF2 para IGF-IR. Este anticuerpo estará en capacidad de ser activo *in vivo* en todos los tipos de tumores que expresan, o con una activación anormal de, R-híbrido o ambos, R-híbrido e IGF-IR incluidos los tumores dependientes de estrógeno de la mama y los tumores de la próstata, que no es el caso para los anticuerpos monoclonales anti-IGF-IR (designados MAb o MAB) disponibles en la actualidad. Efectivamente, αIR3, que se refiere al dominio de IGF-IR, inhibe totalmente el crecimiento de tumores dependientes de estrógeno de la mama (MCF-7) *in vitro*, pero no tiene efecto en el modelo correspondiente *in vivo* (Arteaga C. et al., J. Clin. Invest. 84:1418-1423, 1989). Del mismo modo, el fragmento scFv-Fc derivado del 1H7 monoclonal murino es únicamente activo sobre el tumor de la mama MCF-7 y totalmente inactivo sobre un tumor independiente de andrógeno de la próstata (Li S.L. et al., Cancer Immunol. Immunother., 49:243-252, 2000). Ninguno de estos anticuerpos conocidos se describen como capaces de reconocer, o inhibir la actividad tirosina cinasa de, R-híbrido.

En forma sorprendente, los inventores han evidenciado un anticuerpo quimérico (denominado C7C10) y dos anticuerpos humanizados, designados respectivamente h7C10 forma humanizada 1 y h7C10 forma

humanizada 2, derivados del anticuerpo monoclonal murino 7C10, que reconocen R-híbrido o ambos, R-híbrido e IGF-IR, y correspondientes a todos los criterios ya establecidos, es decir, a un no reconocimiento del receptor sobre la insulina, a un bloqueo en *in vitro* de la proliferación de IGF1 y/o IGF2 inducida, pero igualmente a la inhibición *in vivo* del crecimiento de diferentes tumores que expresan, o con una activación anormal de, R-híbrido o ambos, R-híbrido e IGF-IR, entre los cuales se encuentran un osteosarcoma, un tumor pulmonar amicrocítico y un tumor pancreático BxPC3, pero asimismo y, más particularmente, el tumor dependiente de estrógeno de la mama MCF-7 y un tumor independiente de estrógeno de la próstata DU-145. De igual manera, y en forma sorprendente, la intensidad de inhibición del crecimiento del tumor de células MCF-7 *in vivo* por el anticuerpo 7C10 es comparable, o incluso significativamente superior, a la observada con tamoxifeno, uno de los compuestos de referencia en el tratamiento de tumores dependientes de estrógeno de la mama. Por otra parte, se ha demostrado que estos anticuerpos inhiben la fosforilación de la tirosina de la cadena beta de IGF-IR y de IRS1, el primer sustrato del receptor. Por otra parte, se ha establecido igualmente que estos anticuerpos causan la internalización de dicho receptor y su degradación, contrario a los que habitualmente se observa con ligandos naturales que permiten el rápido reciclaje del receptor en la superficie de las células. Ha sido posible caracterizar estos anticuerpos por su secuencia peptídica y nucleica, especialmente por la secuencia de sus regiones que determinan su complementaridad (CDR) para R-híbrido y/o IGF-IR.

Como el compuesto es preferiblemente de isotipo IgG1, otros mecanismos de acción que implican funciones efectoras, tales como por ejemplo ADCC y/o CDC, podrían explicar la eficacia *in vivo* del anticuerpo de la presente invención.

Por consiguiente, de acuerdo con una primera incorporación, un objeto de la presente invención es un anticuerpo aislado, o uno de sus fragmentos

262

funcionales, caracterizándose dicho anticuerpo o uno de sus dichos fragmentos porque es capaz de unirse al R-híbrido, isoforma(s) A y/o B, e inhibir la unión de su ligando nativo, preferiblemente designado aquí como IGF1 y/o IGF2 y/o insulina, y/o capable de inhibir específicamente la actividad tirosina cinasa de dicho R-híbrido, comprendiendo dicho anticuerpo aislado una cadena ligera que abarca por lo menos una región determinante de complementaridad CDR seleccionada de las CDRs de las secuencia SEQ ID No. 2, 4 y 6, y/o comprendiendo una cadena pesada que abarca por lo menos una CDR seleccionada de las CDRs de las secuencias SEQ ID No. 8, 10 y 12.

En la presente descripción, los términos "unir" y "fijar" tienen el mismo significado y son intercambiables.

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

Tiene que entenderse aquí que la invención no se refiere a los anticuerpos en forma natural, es decir, que ellos no están en su ambiente natural, sino que ha sido posible aislarlos u obtenerlos por purificación de fuentes naturales, u obtenerse también por recombinación genética, o por síntesis química, y que ellos pueden contener entonces aminoácidos no naturales como se describirá más adelante.

Por región CDR o CDR, se quiere indicar las regiones sumamente variables de las cadenas ligeras y livianas de las inmunoglobulinas como se definen por Kabat et al. (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, y ediciones posteriores). Existen 3 CDRs de cadena pesada y 3 CDRs de cadena ligera. El término CDR o CDRs se emplea aquí con el fin de indicar, según sea el caso, una de estas regiones o varias, o incluso la totalidad, de estas regiones que contienen la mayoría de los residuos de aminoácidos responsables de la unión por afinidad del anticuerpo para el antígeno o el epítopo que él reconoce.

Por "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos en el sentido de la presente invención, se quiere indicar el porcentaje de nucleótidos o de residuos idénticos de aminoácidos entre las dos secuencias a compararse, obtenido después de la mejor alineación (alineación óptima), siendo este porcentaje puramente estadístico, y distribuyéndose las diferencias entre las dos secuencias aleatoriamente y en toda su longitud. Las comparaciones de secuencias entres dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos se llevan tradicionalmente a cabo comparando estas secuencias luego de haberlas alineado en una forma óptima, siendo posible llevar a cabo dicha comparación por segmento o por "ventana de comparación". La alineación óptima de las secuencias para la comparación puede realizarse, además de manualmente, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], mediante el algoritmo de homología local de Neddleman y Wunsch (1970) [J. Mol. Biol., 48:443], mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444), mediante software de computador usando estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, o también por software de comparación BLAST N o BLAST P).

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos se determina comparando estas dos secuencias alineadas en una forma óptima y en lo cual la secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos a compararse puede comprender adiciones o eliminaciones con respecto a la secuencia de referencia para una alineación óptima entre estas dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas para las cuales el residuo de nucleótidos o aminoácidos es idéntico entre las dos secuencias, dividiendo este número de posiciones idénticas por el número total de posiciones en la ventana de

comparación y multiplicando el resultado obtenido por 100 con el fin de determinar el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

Por ejemplo, es posible usar el programa BLAST, "BLAST 2 sequences" (Tatusova et al., "Blast 2 sequences- a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) disponible en el sitio http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html, siendo los parámetros utilizados aquellos dados por defecto (en particular para los parámetros "sanción de intervalo abierto": 5, y "sanción de intervalo de extensión": 2; siendo la matriz seleccionada, por ejemplo, la matriz "BLOSUM 62" propuesta por el programa), calculándose directamente por el programa el porcentaje de identidad entre las dos secuencias a compararse.

Por secuencia de aminoácidos con por lo menos 80%, preferiblemente 85%, 90%, 95% y 98% de identidad con una secuencia de aminoácidos de referencia, teniendo aquellos, con respecto a la secuencia de referencia, ciertas modificaciones, en particular una eliminación, adición o sustitución de por lo menos un aminoácido, se prefieren un truncamiento o un alargamiento. En el caso de una sustitución de uno o más aminoácido(s) consecutivo(s) o no consecutivo(s), se prefieren las sustituciones en las cuales los aminoácidos sustituidos se reemplazan por aminoácidos "equivalentes". La expresión "aminoácidos equivalentes" tiene aquí como finalidad indicar cualquier aminoácido capaz de sustituirse con uno de los aminoácidos de la estructura base sin modificar, no obstante, esencialmente las actividades biológicas de los correspondientes anticuerpos y tales como se definirán posteriormente, en especial en los ejemplos.

Estos aminoácidos equivalentes pueden determinarse ya sea con base en su homología estructural con los aminoácidos que ellos reemplazan, o ya sea con base en los resultados de ensayos comparativos de actividad biológica entre los diferentes anticuerpos capaces de llevarse a cabo.

A manera de ejemplo, se hace mención de las posibilidades de sustitución que pueden llevarse a cabo sin resultar en una profunda modificación de la actividad biológica del correspondiente anticuerpo

modificado. Así es posible reemplazar leucina por valina o isoleucina, ácido aspártico por ácido glutámico, glutamina por asparagina, arginina por lisina, etc., siendo las sustituciones inversas naturalmente concebibles bajo las mismas condiciones.

Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención son preferiblemente anticuerpos monoclonales específicos, en especial de origen murino, quimérico o humanizado, que pueden obtenerse de acuerdo con los métodos estándar bien conocidos por la persona experta en el arte.

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

Los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención pueden obtenerse, por ejemplo, de una célula animal inmunizada contra el R-híbrido o ambos, el R-híbrido e IGF-IR, o uno de sus fragmentos que contenga el epítopo específicamente reconocido por dichos anticuerpos monoclonales, de acuerdo con la invención. Dicho R-híbrido o ambos, R-híbrido e IGF-IR, o uno de sus dichos fragmentos, pueden producirse especialmente de acuerdo con los métodos de trabajo usuales, por recombinación genética empezando con una secuencia de ácidos nucleicos contenida en la secuencia cADN que codifica para el R-híbrido o el IGF-IR o por síntesis de péptidos de una secuencia de aminoácidos comprendida en la secuencia de péptidos del R-híbrido o el IGF-IR.

Los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención pueden purificarse, por ejemplo, en una columna de afinidad, en la cual el R-

híbrido y/o el IGF-IR, o uno de sus fragmentos, que contiene el epítopo específicamente reconocido por dichos anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención, se ha inmovilizado previamente. Más particularmente, dichos anticuerpos monoclonales pueden purificarse por cromatografía en proteína A y/o G, seguida o no seguida por cromatografía de intercambio iónico orientada a eliminar los contaminantes de proteína residual, así como el ADN y LPS, en sí misma seguida o no seguida por cromatografía de exclusión en gel de sefarosa con el fin de eliminar los agregados potenciales debidos a la presencia de dímeros o de otros multímeros. En una forma incluso más preferida, la totalidad de estas técnicas pueden usarse simultánea o sucesivamente. Tal purificación puede hacerse al mismo tiempo o secuenciarse con, en primer lugar, un reconocimiento en R-híbrido y, en un segundo paso, el reconocimiento del IGF-IR.

Anticuerpos quiméricos o humanizados se incluyen igualmente en los anticuerpos de acuerdo con la presente invención.

Por anticuerpo quimérico, se quiere indicar un anticuerpo que contiene una región variable natural (cadena ligera y cadena pesada) derivada de un anticuerpo de una especie dada, en combinación con las regiones constantes de cadena ligera y cadena pesada de un anticuerpo de una especie heteróloga a dicha especie dada.

Los anticuerpos o sus fragmentos de tipo quimérico de acuerdo con la invención pueden prepararse usando técnicas de recombinación genética. Por ejemplo, el anticuerpo quimérico puede producirse clonando un ADN recombinante que contiene un promotor y una secuencia que codifica para la región variable de un anticuerpo monoclonal no humano, especialmente murino, de acuerdo con la invención, y una secuencia que codifica para la región constante de un anticuerpo humano. Un anticuerpo quimérico de la invención codificado por dicho gen recombinante será, por ejemplo, una quimera ratón-hombre, determinándose la especificidad de este anticuerpo por la región variable derivada del ADN murino y determinándose su isotipo por la región constante derivada del ADN humano. Para los

métodos de preparación de anticuerpos quiméricos, es posible, por ejemplo, consultar el documento Verhoeyn et al. (BioEssays, 8:74, 1988).

Por anticuerpo humanizado se quiere indicar un anticuerpo que contiene regiones CDR derivadas de un anticuerpo de origen no humano, derivándose las demás partes de la molécula del anticuerpo de uno (o de varios) anticuerpos humanos. Por otra parte, algunos de los residuos de los segmentos del esqueleto (denominados FR) pueden modificarse con el fin de conservar la afinidad de la unión (Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986; Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536, 1988; Riechmann et al., Nature, 332:323-327, 1988).

Los anticuerpos humanizados de acuerdo con la invención, o sus fragmentos, pueden prepararse por técnicas conocidas por el experto en el arte (tales como, por ejemplo, las descritas en los documentos Singer et al., J. Immun., 150:2844-2857, 1992; Mountain et al., Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10:1-142,1992; o Bebbington et al., Bio/Technology, 10:169-175, 1992). Tales anticuerpos humanizados de acuerdo con la invención son preferidos por su uso en métodos diagnósticos *in vitro*, o tratamiento profiláctico y/o terapéutico *in vivo*.

Por fragmento funcional de un anticuerpo de acuerdo con la invención, se quiere indicar en particular un fragmento de anticuerpo, tales como fragmentos Fv, scFv (sc significa cadena única), Fab, $F(ab')_2$, Fab', scFv-Fc o diacuerpos, o cualquier fragmento cuyo tiempo de semivida se habría incrementado por modificación química, tal como la adición de poli(alquilen) glicol tales como poli(etilen) glicol ("PEGilación") (fragmentos PEGilados designados Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, $F(ab')_2$-PEG o Fab'-PEG) ("PEG" pro Poli(Etilen)Glicol), o por incorporación en un liposoma, teniendo dichos fragmentos por lo menos una de las CDRs características de la secuencia SEQ ID No. 2, 4, 6, 8, 10 ó 12 de acuerdo con la invención, y, especialmente, en que es capaz de ejercer de una manera general una actividad incluso parcial del anticuerpo del cual desciende, tal como, en particular, la capacidad de reconocer y unirse a el

R-híbrido o ambos, el R-híbrido e IGF-IR, y, si es necesario, inhibir la actividad del R-híbrido o ambos, el R-híbrido y el IGF-IR.

Preferiblemente, dichos fragmentos funcionales se constituirán por o comprenderán una secuencia parcial de la cadena variable ligera y pesada del anticuerpo del cual se derivan, siendo dicha secuencia parcial suficiente para conservar la misma especificidad de unión que el anticuerpo del cual desciende, y una afinidad suficiente, preferiblemente por lo menos igual a 1/100, de una manera más preferida, a por lo menos 1/10, de la del anticuerpo del cual desciende, con respecto al R-híbrido o ambos, R-híbrido e IGF-IR.

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

Preferiblemente, estos fragmentos funcionales serán fragmentos de tipo Fv, scFv, Fab, $F(ab')_2$, F(ab'), scFv-Fc, scFV-CH_3 o diacuerpos, que generalmente tienen la misma especificidad de unión que el anticuerpo del cual descienden. De acuerdo con la presente invención, los fragmentos de anticuerpo de la invención pueden obtenerse de anticuerpos, tales como los ya descritos, por métodos tales como digestión por enzimas, tales como pepsina o papaína y/o por segmentación de los puentes disulfuro mediante reducción química. En otra manera, los fragmentos de anticuerpo comprendidos en la presente invención pueden obtenerse por técnicas de recombinación genética, igualmente bien conocidas por el experto en el arte o también por síntesis de péptidos mediante, por ejemplo, sintetizadores automáticos de péptidos tales como los suministrados por la compañía Applied Biosystems, etc.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención concierne al anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, como se describe anteriormente, caracterizándose dicho anticuerpo porque es también capaz de unir el IGF-IR e inhibir la unión de sus ligandos nativos, preferiblemente designados aquí como IGF1 y/o IGF2, y/o es capaz de inhibir específicamente la actividad tirosina cinasa de dicho IGF-IR.

En una manera más preferida, la invención comprende los anticuerpos, o sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la presente invención, especialmente anticuerpos quiméricos o humanizados, obtenidos por recombinación genética o por síntesis química.

En una incorporación preferida, un objeto de la invención es un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la invención, caracterizado porque comprende una cadena pesada que abarca por lo menos una CDR seleccionada de las CDRs de las secuencias SEQ ID No. 8, 10 y 12 o una secuencia que posee por lo menos 80% de identidad luego de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID No. 8, 10 y 12.

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

Se sabe que sólo un bajo porcentaje de los aminoácidos de las CDRs contribuyen a la construcción de un sitio de unión del anticuerpo, pero estos residuos tienen que mantenerse en una configuración tridimensional muy específica.

En una manera más preferida, la presente invención se refiere a un anticuerpo o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la invención, caracterizado porque comprende una cadena pesada que abarca por lo menos dos de las tres CDRs o las tres CDRs de las secuencias SEQ ID No. 8, 10 y 12, o por lo menos dos de las tres CDRs o tres CDRs de

secuencia que posee respectivamente por lo menos 80% de identidad luego de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID No. 8, 10 y 12.

En una incorporación igualmente preferida, un objeto de la invención es un anticuerpo o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la invención, caracterizado porque comprende una cadena ligera que abarca por lo menos una CDR seleccionada de las CDRs de las secuencias SEQ ID No. 2, 4 y 6, o una CDR cuya secuencia posee por lo menos 80% de identidad luego de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID No. 2, 4 y 6.

En una incorporación más preferida, un objeto de la invención es un anticuerpo o uno de sus fragmentos funcionales de acuerdo con la invención, caracterizado porque comprende una cadena ligera que abarca por lo menos dos de las tres CDRs o las tres CDRs de las secuencias SEQ ID No. 2, 4 y 6, o por lo menos dos de tres CDRs o tres CDRs de secuencia que posee respectivamente por lo menos 80% de identidad luego de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID No. 2, 4 y 6.

En una manera más preferida, el anticuerpo o uno de sus fragmentos funcionales de acuerdo con la invención se caracteriza porque comprende una cadena pesada que abarca las tres CDRs de secuencias SEQ ID No. 8, 10 y 12, o tres CDRs de secuencia que posee respectivamente por lo menos 80% de identidad luego de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID No. 8, 10 y 12, y porque él, por otra parte, comprende una cadena ligera que abarca las tres CDRs de las secuencias SEQ ID No. 2, 4 y 6, o tres CDRs de secuencia que posee respectivamente por lo menos 80% de identidad luego de la alineación óptima con las secuencias SEQ ID No. 2, 4 y 6.

De acuerdo con otro aspecto, un objeto de la presente invención es un anticuerpo o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la invención, caracterizado porque no se une o no se fija en una manera significativa al IR humano.

En una manera preferida, dichos fragmentos funcionales, de acuerdo con la presente invención, se elegirán de los fragmentos Fv, scFv, Fab, $(Fab')_2$, Fab', scFv-Fc, scFV-CH_3 o diacuerpos, o cualquier fragmento

funcional, cuya semivida se habría incrementado por una modificación química, especialmente PEGilación, o por incorporación en un liposoma.

De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere con un hibridoma murino capaz de segregar un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente invención, especialmente el hibridoma de origen murino tal como se encuentra depositado en el Centre National de Culture De Microorganisme (CNCM, National Center of Microorganism Culture) (Institut Pasteur, París, Francia) el 19 de septiembre de 2001 bajo el número I-2717.

El anticuerpo monoclonal, designado aquí 7C10, o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque dicho anticuerpo se segrega por el hibridoma depositado en el CNCM el 19 de septiembre de 2001 bajo el número I-2717 es, lógicamente, parte de la presente invención.

En una incorporación particular, la presente invención se refiere a un anticuerpo murino, o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la invención, caracterizado porque dicho anticuerpo comprende una cadena ligera de secuencia que abarca la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 54, o una secuencia que posee por lo menos 80% de identidad luego de la alineación óptima con la secuencia SEQ ID No. 54, o/y porque comprende una cadena pesada de secuencia que abarca la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 69, o una secuencia que posee por lo menos 80% de identidad luego de la alineación óptima con la secuencia de SEQ ID No. 69.

De acuerdo con un aspecto igualmente particular, la presente invención se refiere a un anticuerpo quimérico, o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la invención, caracterizado porque dicho anticuerpo comprende por otra parte las regiones constantes de cadena ligera y cadena pesada derivadas de un anticuerpo de una especie heteróloga al ratón, especialmente al hombre y, en una manera preferida, porque las regiones constantes de cadena ligera y cadena pesada derivadas de un anticuerpo humano son respectivamente la región kappa o lambda y gamma-1, gamma-2 o gamma-4.

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

De acuerdo con una incorporación preferida, el anticuerpo humanizado, o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la presente invención se caracteriza porque dicho anticuerpo humanizado comprende una cadena ligera que abarca la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 61 ó 65, o una secuencia que posee por lo menos 80% de identidad luego de la alineación óptima con la secuencia SEQ ID No. 61 ó 65, o/y porque comprende una cadena pesada que abarca la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 75, 79 ó 83, o una secuencia que posee por lo menos 80% de identidad luego de la alineación óptima con la secuencia SEQ ID No. 75, 79 u 83.

Preferiblemente, el anticuerpo humanizado, o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la invención se caracteriza porque dicho anticuerpo humanizado comprende una cadena ligera que abarca la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 65, y porque comprende una cadena pesada de secuencia que abarca la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 79 u 83, preferiblemente SEQ ID No. 83.

De acuerdo con un aspecto novedoso, la presente invención se refiere a un ácido nucleico aislado, caracterizado porque éste se selecciona de los siguientes ácidos nucleicos:

a) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica para un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la invención;

b) un ácido nucleico complementario de un ácido nucleico tal como se define en a); y

c) un ácido nucleico de por lo menos 18 nucleótidos capaz de hibridar bajo condiciones de gran rigurosidad con por lo menos una de las CDRs de las secuencias de ácidos nucleicos SEQ ID No. 1, 3, 5, 7, 9 u 11, o con una secuencia que posee por lo menos 80%, preferiblemente 85%, 90%, 95% y 98%, de identidad luego de la alineación óptima con la secuencia SEQ ID No. 1, 3, 5, 7, 9 u 11.

Por ácido nucleico, nucleico o secuencia de ácidos nucleicos, polinucleótido, oligonucleótido, secuencia de polinucleótidos, secuencia de nucleótidos, términos que se emplearán indiferentemente en la presente invención, se quiere indicar un ligamiento preciso de nucleótidos, que son modificados o no modificados, que permiten definir un fragmento o una región de un ácido nucleico, que contienen o no contienen nucleótidos no naturales, y que están en capacidad de corresponder exactamente a un ADN de doble hebra, un ADN de una sola hebra como a los productos de transcripción de dichos ADNs.

Aquí tiene que entenderse asimismo que la presente invención no concierne a las secuencias de nucleótidos en su ambiente cromosómico natural, es decir, en el estado natural. Concierne a secuencias que se han aislado y/o purificado, es decir, que se han seleccionado directa o indirectamente, por ejemplo por copia, habiéndose modificado su ambiente por lo menos parcialmente. Por consiguiente, se quiere indicar igualmente aquí que los ácidos nucleicos aislados, obtenidos por recombinación genética por medio, por ejemplo, de células anfitrionas u obtenidos por síntesis química.

Por secuencias nucleicas con un porcentaje de identidad de por lo menos 80%, preferiblemente 85%, 90%, 95% y 98%, luego de la alineación óptima con una secuencia preferida, se quiere indicar las secuencias nucleicas que poseen, con respecto a la secuencia nucleica de referencia, ciertas modificaciones tales como, en particular, una eliminación, un truncamiento, un alargamiento, una fusión quimérica y/o una sustitución, especialmente una sustitución puntual. Concierne preferiblemente a

secuencias en las cuales las secuencias codifican para las mismas secuencias de aminoácidos como la secuencia de referencia, asociándose esto a la degeneración del código genético, o secuencias complementarias que son capaces de hibridarse específicamente con las secuencias de referencia, preferiblemente bajo condiciones de alta rigurosidad, especialmente tal como se define más adelante.

Una hibridación bajo condiciones de alta rigurosidad significa que las condiciones de temperatura y las condiciones de concentración iónica se seleccionan de tal manera que permitan el mantenimiento de la hibridación entre dos fragmentos de ADN complementario. A modo de ilustración, condiciones de alta rigurosidad del paso de hibridación para efectos de definir los fragmentos de polinucleótidos ya descritos son ventajosamente las siguientes.

La hibridación ADN-ADN o ADN-ARN se lleva a cabo en dos pasos: (1) pre-hibridación a 42°C durante 3 horas en tampón de fosfato (20 mM, pH 7.5) que contiene 5 x SSC (1 x SSC corresponde a una solución de 0.15 M NaCl + 0.015 M citrato de sodio), 50% de formamida, 7% de dodecil sulfato de sodio (SDS), 10 x Denhardt's, 5% de sulfato de dextrina y 1% de ADN de esperma de salmón; (2) hibridación actual durante 20 horas a una temperatura que depende del tamaño de la sonda (es decir: 42°C, para un tamaño de sonda > 100 nucleótidos) seguida por 2 lavados de 20 minutos a 20°C en 2 x SSC + 2% de SDS, 1 lavado de 20 minutos a 20°C en 0.1 x SSC + 0.1% de SDS. El último lavado se lleva a cabo en 0.1 x SSC + 0.1% de SDS durante 30 minutos a 60°C para un tamaño de sonda > 100 nucleótidos. Las condiciones de hibridación de alta rigurosidad ya descritas para un polinucleótido de tamaño definido pueden adaptarse por el experto en el arte para oligonucleótidos de mayor o menor tamaño, de acuerdo con la enseñanza de Sambrook et al. (1989, Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor).

La invención se refiere igualmente a un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

La invención apunta especialmente a los vectores de clonación y/o expresión que contienen una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención.

Los vectores de acuerdo con la invención contienen preferiblemente elementos que permiten la expresión y/o la secreción de las secuencias de nucleótidos en una célula anfitriona determinada. Por lo tanto, el vector tiene que contener un promotor, señales de iniciación y terminación de traducción, así como regiones apropiadas de regulación de transcripción. Tiene que estar en capacidad de mantenerse en una manera estable en la célula anfitriona y puede, en forma opcional, tener señales particulares que especifican la secreción de la proteína traducida. Estos diferentes elementos se seleccionan y optimizan por el experto en el arte como función de la célula anfitriona utilizada. A este efecto, las secuencias de nucleótidos de acuerdo con la invención pueden insertarse en vectores de replicación autónoma en el anfitrión seleccionado, o ser vectores integradores del anfitrión seleccionado.

Tales vectores se preparan por métodos actualmente empleados por el experto en el arte, y los clones resultantes pueden introducirse en un anfitrión apropiado por métodos estándar, tales como lipofección, electroporación, choque térmico, o métodos químicos.

Los vectores de acuerdo con la invención son, por ejemplo, vectores de origen plasmídico o vírico. Éstos son útiles para transformar células anfitrionas con el fin de clonar o expresar las secuencias de nucleótidos de acuerdo con la invención.

Del mismo modo, la invención comprende las células anfitrionas transformadas o que comprenden un vector de acuerdo con la invención.

La célula anfitriona puede seleccionarse de sistemas procarióticos o eucarióticos, por ejemplo células bacterianas pero, asimismo, células de levadura o células animales, en particular células mamíferas. Es igualmente posible usar células de insectos o células vegetales.

La invención concierne también a animales, excepto el hombre, que comprenden por lo menos una célula transformada de acuerdo con la invención.

De acuerdo con otro aspecto, un objeto de la invención es un proceso para la producción de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales de acuerdo con la invención, caracterizado porque comprende las siguientes fases:

a) el cultivo en un medio y condiciones de cultivo apropiadas de una célula anfitriona de acuerdo con la invención; y

b) la recuperación de dichos anticuerpos, o uno de sus fragmentos funcionales, así producidos del medio de cultivo o dichas células cultivadas.

Las células transformadas de acuerdo con la invención pueden utilizarse en procesos para la preparación de polipéptidos recombinantes de acuerdo con la invención. Los procesos para la preparación de un polipéptido de acuerdo con la invención en forma recombinante, caracterizados porque emplean un vector y/o una célula transformada por un vector de acuerdo con la invención, se encuentran abarcados ellos mismos en la presente invención. Preferiblemente, una célula transformada por un vector de acuerdo con la invención se cultiva bajo condiciones que permiten la expresión de dicho polipéptido, y dicho péptido recombinante se recupera.

Como se ha dicho, la célula anfitriona puede seleccionarse de sistemas procarióticos o eucarióticos. En particular, es posible identificar secuencias de nucleótidos de acuerdo con la invención, facilitando la secreción en tal sistema procariótico o eucariótico. Por lo tanto, un vector de acuerdo con la invención, que lleva tal secuencia, puede utilizarse ventajosamente para la producción de proteínas recombinantes, previstas para secretarse. Efectivamente, la purificación de estas proteínas recombinantes de interés se facilitará por el hecho de que están presentes en el sobrenadante del cultivo celular y no en el interior de las células anfitrionas.

Es igualmente posible preparar los polipéptidos de acuerdo con la invención por síntesis química. Tal proceso de preparación es asimismo un

objeto de la invención. El experto en el arte conoce los procesos de síntesis química, por ejemplo las técnicas que emplean fases sólidas (ver especialmente Steward et al., 1984, Solid phase peptide synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2nd ed., (1984)) o técnicas que emplean fases sólidas parciales, por condensación de fragmentos o por una síntesis clásica en solución. Los polipéptidos obtenidos por síntesis química y que están en capacidad de contener aminoácidos no naturales correspondientes están cubiertos asimismo en la invención.

Los anticuerpos, o uno de sus fragmentos funcionales, capaces de obtenerse por un proceso de acuerdo con la invención están cubiertos asimismo en la presente invención.

De acuerdo con una segunda incorporación, la presente invención concierne a un anticuerpo de acuerdo con la invención, tal como ya se describió con mayor detalle, caracterizado porque es, por otra parte, capaz de unirse específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico humano EGFR y/o capaz de inhibir específicamente la actividad tirosina cinasa de dicho EGFR.

En una manera general, los factores de crecimiento son pequeñas proteínas involucradas en la regulación de la proliferación y de la diferenciación de células normales. Algunos de estos factores de crecimiento juegan igualmente un papel importante en la iniciación y el mantenimiento de la transformación celular, siendo capaces de funcionar como factores autócrinos o parácrinos. Éste es especialmente el caso, además del IGF1 ya descrito con más detalle, para el factor de crecimiento epidérmico EGF, que parece particularmente involucrado en la aparición del fenotipo del tumor, la evolución de los tumores y la generación de metástasis.

EGF y IGF1 ejercen su acción a través del intermediario de su respectivo receptor, denominado aquí EGFR y R-híbrido o ambos, el R-híbrido con IGF-IR. Éste concierne en los dos casos a receptores de membrana con actividad tirosina cinasa, cuya sobre-expresión se describe en numerosas neoplasias malignas. Tiene que notarse, sin embargo, que la

interacción de estos dos receptores no está claramente establecida y que los estudios llevados a cabo por varios equipos en conexión con esto arrojan resultados contradictorios en cuanto a la colaboración de estos dos receptores.

Estudios realizados con células tumorales de la próstata muestran que la interrupción del lazo autócrino (***"the autocrine loop"***) EGF/EGFR por un anticuerpo monoclonal anti-EGFR (designado aquí "MAB" o "MAb") se manifiesta por una pérdida completa de la respuesta de las células DU145 al IGF1 (Connolly J. M. and Rose D.P., Prostate, Apr. 24(4): 167-75, 1994; Putz T. et al., Cancer Res., Jan. 1, 59(1): 227-33, 1999). Estos resultados sugerirían que un bloqueo del receptor para el EGF sería suficiente con el fin de obtener una inhibición total de las señales de transformación generadas por la activación de los tres receptores (EGFR, R-híbrido e IGF-IR). De otra parte, otros estudios (Pietrzkowski et al., Cell Growth Differ, Apr., 3(4): 199-205, 1992; Coppola et al., Mol Cell Biol., Jul., 14(7):4588-95, 1994) han demostrado que una sobre-expresión de EGFR necesita la presencia de un IGF-IR funcional con el fin de ejercer su potencial mitógeno y transformante, aunque IGF-IR no requiere, por su parte, la presencia del EGFR funcional con el fin de mediar su acción. Esta segunda serie de estudios estaría más de acuerdo con una estrategia que tienda preferencialmente a bloquear el R-híbrido o R-híbrido con IGF-IR, con la intención de afectar simultáneamente los dos receptores.

En una manera sorprendente, los inventores han demostrado, en primer lugar, que una inhibición conjunta de la unión del IGF1 y/o IGF2 y/o insulina al R-híbrido o ambas, la unión del IGF1 y/o IGF2 y/o insulina al R-híbrido con la unión del IGF1 y/o IGF2 al IGF-IR y de la unión del EGF al EGFR permite obtener una sinergia significativa de estos dos efectos contra el crecimiento tumoral *in vivo* en ratones desprotegidos inmunitariamente, afectados con un tumor que expresa estos tres receptores. Una de las hipótesis más probables que pueden explicar esta sinergia de acciones es que los dos factores de crecimiento EGF e IGF1 (y/o IGF2) actúan ellos mismos en sinergia en la transformación de células normales en células con

carácter tumoral y/o en el crecimiento y/o la proliferación de células tumorales para ciertos tumores, especialmente para aquellos que sobre-expresan, o con una activación anormal de, los tres receptores EGFR, R-híbrido e IGF-IR y/o que tienen una sobreactivación de la señal de transducción mediada por estos tres receptores, en particular al nivel de la actividad tirosina cinasa de estos receptores.

De acuerdo con un aspecto preferido de esta incorporación, la invención concierne a un anticuerpo tal como el ya descrito con más detalle, caracterizado porque consta de un anticuerpo bi-específico que comprende un segundo motivo que inhibe específicamente la unión del EGF al EGFR y/o inhibe específicamente la actividad tirosina cinasa de dicho EGFR.

El término "segundo motivo" quiere indicar, más arriba, especialmente una secuencia de aminoácidos, que comprende un fragmento capaz de unirse específicamente a EGFR, en particular una región CDR de una cadena variable de un anticuerpo anti-EGFR, o uno de los fragmentos de esta región CDR de longitud suficiente, con el fin de ejercer esta unión específica, o varias regiones CDR más de un anticuerpo anti-EGFR.

Los anticuerpos bi-funcionales o bi-específicos forman una segunda generación de anticuerpos monoclonales, en los cuales dos regiones variables diferentes se combinan en la misma molécula (Hollinger and Bohlen, 1999, Cancer and metastasis rev., 18:411-419). Su uso se ha demostrado tanto en el campo diagnóstico como en el campo terapéutico por su capacidad de reclutar nuevas funciones efectoras o reconocer (*"to target"*) varias moléculas en la superficie de células tumorales. Estos anticuerpos pueden obtenerse por métodos químicos (Glennie MJ et al., 1987, J. Immunol., 139:2367-2375; Repp R. et al., 1995, J. Hemat., 377-382) o métodos somáticos (Staerz U.D. and Bevan M.J., 1986, PNAS 83:1453-1457; Suresh M.R. et al., 1986, Method Enzymol., 121:210-228) pero asimismo y preferencialmente por técnicas de ingeniería genética, que permiten forzar la heterodimerización y facilitan así el proceso de purificación del anticuerpo buscado (Merchand et al., 1998, Nature Biotech., 16:677-681).

Estos anticuerpos bi-específicos pueden construirse como IgG entera, como Fab'2 bi-específicos, como Fab'PEG o como diacuerpos o además como scFv bi-específicos, pero también como un anticuerpo bi-específico tetravalente, o están presentes dos sitios de unión para cada antígeno tomado como diana (Park et al., 2000, Mol. Immunol., 37(18):1123-30) o sus fragmentos, como ya se describió con más detalle.

Aparte de una ventaja económica derivada del hecho de que la producción y la administración de un anticuerpo bi-específico son menos onerosas que la producción de dos anticuerpos específicos, el uso de tales anticuerpos bi-específicos tiene la ventaja de reducir la toxicidad del tratamiento. Esto se debe a que el uso de un anticuerpo bi-específico permite reducir la cantidad total de anticuerpos en circulación y, en consecuencia, la posible toxicidad.

En una incorporación preferida de la invención, el anticuerpo bi-específico es un anticuerpo bivalente o tetravalente.

En la práctica, el interés en usar un anticuerpo bi-específico tetravalente es que posee una mayor avidez en comparación con un anticuerpo bivalente por cuenta de la presencia de tres sitios de unión para cada diana, respectivamente IGF-IR, R-híbrido y EGFR en la presente invención.

En una manera similar a la selección de los fragmentos funcionales del anti-R-híbrido o ambos, anti-R-híbrido y anticuerpo anti-IGF-IR ya descritos, dicho segundo motivo se selecciona de los fragmentos Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fab', scFv, scFv-Fc, scFv-CH_3 y los diacuerpos, o cualquier forma cuya semivida se habría incrementado análogamente a los fragmentos pegilados, tales como Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, $F(ab')_2$-PEG o Fab'-PEG. De acuerdo con aspecto aún más preferido de la invención, dicho segundo motivo anti-EGFR se deriva del anticuerpo monoclonal de ratón 225, su derivado quimérico ratón-hombre C225, o un anticuerpo humanizado derivado de este anticuerpo 225.

De acuerdo con todavía otro aspecto, un objeto de la invención es un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la

invención como un medicamento, preferiblemente un anticuerpo humanizado, tal como ya se definió. Anticuerpo, para el resto de la presente descripción, tiene que entenderse como un anticuerpo i) anti-R-híbrido o ii) ambos, anti-R-híbrido y anti-IGF-IR, así como un anticuerpo bi-específico anti-R-híbrido/EGFR o ambos anti-R-híbrido y anti-IGF-IR/EGFR.

De igual forma, la invención concierne a una composición farmacéutica que comprende, a modo de principio activo, un compuesto conformado por un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales de acuerdo con la invención, preferiblemente mezclado con un excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con todavía otra incorporación, la presente invención concierne asimismo a una composición farmacéutica, tal como la ya descrita con más detalle, que comprende a un segundo compuesto seleccionado de los compuestos capaces de inhibir específicamente la unión del EGF al receptor de factor de crecimiento epidérmico humano EGFR y/o capaces de inhibir específicamente la actividad tirosina cinasa de dicho EGFR.

En un aspecto preferido de la invención, dicho segundo compuesto se selecciona de los anticuerpos anti-EGFR aislados, o sus fragmentos funcionales, capaces de inhibir por competición la unión del EGF al EGFR. Más particularmente, dicho anticuerpo anti-EGFR se selecciona, de los anticuerpos anti-EGFR monoclonales, quiméricos o humanizados, o sus fragmentos funcionales. Aún más particularmente, dichos fragmentos funcionales del anticuerpo anti-EGFR se seleccionan de los fragmentos Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fab', scFv-Fc, scFv-CH_3 o diacuerpos, o cualquier fragmento cuya semivida se habría incrementado, análogamente a fragmentos pegilados. Dicho anticuerpo puede constar, en una manera más preferida, del anticuerpo monoclonal de ratón 225, su derivado quimérico ratón-hombre C225 (designado también IMC-C225) o un anticuerpo humanizado derivado de este anticuerpo 225.

Otra incorporación complementaria de la invención consta de una composición tal como la ya descrita que comprende, por otra parte, como un producto de combinación para el uso simultáneo, separado o consecutivo, un agente citotóxico/citostático y/o un inhibidor de la actividad tirosina cinasa, respectivamente, de los receptores para IGF1 y/o para EGF, un agente corticoesteroide, un agente anti-emético, una vacuna contra el cáncer, un agente analgésico, un agente anti-vascular y/o un agente anti-proliferativo. Tales agentes se describirán con más detalle a partir de ahora en la presente especificación.

"Uso simultáneo" se entiende como sinónimo de la administración de los dos compuestos de la composición de acuerdo con la invención en una formulación farmacéutica única e idéntica.

"Uso separado" se entiende como sinónimo de la administración, al mismo tiempo, de los dos compuestos de composición de acuerdo con la invención en formulaciones farmacéuticas distintas.

"Uso consecutivo" se entiende como sinónimo de la administración sucesiva de los dos compuestos de la composición de acuerdo con la invención, cada uno en una presentación farmacéutica distinta.

De manera general, la composición de acuerdo con la invención aumenta considerablemente la eficacia del tratamiento del cáncer. En otras palabras, el efecto terapéutico del anticuerpo anti-R-híbrido o ambos, anti-R-híbrido y anti-IGF-IR de acuerdo con la invención se potencia en forma inesperada por la administración de un agente citotóxico. Otra ventaja importante subsiguiente producida por una composición de acuerdo con la invención concierne a la posibilidad de emplear dosis eficaces menores de principio activo, que permite evitar o reducir los riesgos de aparición de efectos secundarios, en particular los efectos del agente citotóxico.

Además, esta composición de acuerdo con la invención permitiría esperar la consecución de un efecto terapéutico más rápidamente.

En una incorporación particularmente preferida, dicha composición, como un producto de combinación de acuerdo con la invención, se caracteriza porque dicho agente citotóxico/citostático se selecciona de los

agentes que interactúan con el ADN, los antimetabolitos, los inhibidores de topoisomerasa I o II, o también el inhibidor de husillo o agentes estabilizantes o cualquier otro agente capaz de empelarse en quimioterapia. Tales agentes citotóxicos/citostáticos, para cada una de las clases ya mencionadas de agentes citotóxicos, se citan, por ejemplo, en la edición 2001 de VIDAL, en la página dedicada a los compuestos anexados a la columna cancerología y hematología "Cytotoxics", estos compuestos citotóxicos citados con referencia a este documento se relacionan aquí como agentes citotóxicos preferidos.

En una incorporación particularmente preferida, dicha composición, como producto de combinación de acuerdo con la invención, se caracteriza porque dicho agente citotóxico se acopla químicamente a dicho anticuerpo para uso simultáneo.

En una incorporación particularmente preferida, dicha composición de acuerdo con la invención se caracteriza porque dicho agente citotóxico/citostático se selecciona del inhibidor de husillo o agentes estabilizantes, preferiblemente vinorelbina y/o vinflunina y/o vincristina.

Inmunoliposomas son liposomas capaces de transportar compuestos, tales como agentes citotóxicos y/o citostáticos, como ya se describieron, y dirigirlos a células tumorales por medio de anticuerpos o de fragmentos de anticuerpo unidos a su superficie. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo utilizados se dirigen contra antígenos sobre-expresados en la superficie de células tumorales y/o antígenos de superficie, cuya expresión se restringe a células tumorales. Ellos se dirigen preferiblemente contra receptores de tirosina cinasa y, más particularmente, contra los receptores para IGF-I, EGF o también VEGF. Un anticuerpo preferido es un anticuerpo monoclonal o policlonal, preferiblemente monoclonal, o incluso humanizado, que reconocerá el R-híbrido o amnos, el R-híbrido y el IGF-IR específicamente y con alta afinidad. Aún más preferiblemente, este anticuerpo consta del anticuerpo que es objeto de la presente invención.

El uso de inmunoliposomas para inhibir el crecimiento de células tumorales se ha descrito en la literatura. A modo de ejemplo, pueden

mencionarse los inmunoliposomas que reconocen proteínas, tales como ErbB2 (Hurwitz E. et al., Cancer Immunol. Immunother, 49: 226-234, 2000; Park J.W. et al., Clinical Cancer Res., 8:1172-1181, 2002) o EGFR (Harding J.A. et al., Biochim. Biophys. Acta, 1327:181-192,1997), o glicolípidos tales como el ganglíosido GD2 (Pastorino F. et al., Cancer Res., 63:86-92, 2003).

Los inmunoliposomas combinan las ventajas de los liposomas y de los inmunoconjugados. En efecto, los liposomas posibilitan encapsular agentes citotóxicos y/o citostáticos y, por consiguiente, protegerlos contra la degradación. Tienen además la ventaja de disminuir la toxicidad de los agentes transportados y de reducir los efectos secundarios que inducen. Por lo tanto, pueden permitir el uso de agentes que son mucho más tóxicos que los agentes utilizados convencionalmente en quimioterapias anti-cáncer. La conjugación de anticuerpos o de fragmentos de anticuerpo a la superficie de liposomas tiene la ventaja de proporcionar un sistema para reconocimiento específico y direccionamiento del agente citotóxico encapsulado en el liposoma. Además, a diferencia de los inmunoconjugados, puesto que el agente transportado no se acopla covalentemente al anticuerpo o al fragmento de anticuerpo, será completamente activo tan pronto como se introduzca en la célula diana.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo pueden unirse, sin limitación de ninguna clase, covalentemente a la superficie de los liposomas usando métodos convencionales o bioconjugación. El acoplamiento de estos anticuerpos o de los fragmentos se llevará a cabo en los lípidos o lípidos que portan un PEG, que se han insertado en la membrana liposómica. El caso de un lípido-PEG, el acoplamiento se llevará a cabo en el PEG en la posición distal con respecto al lípido. Liposomas que llevan grupos PEG (liposomas injertados con PEG) poseen la ventaja de tener semividas más largas que los liposomas "desnudos". A modo de ejemplo, puede mencionarse el acoplamiento del anticuerpo o del fragmento, mediante grupos tiol, a los lípidos activados o lípidos-PEG que exhiben grupos maleimida o bromoacetilo. Los grupos tiol para estos tipos de

acoplamiento pueden provenir de 2 fuentes. Éstos pueden ser residuos de cisteína libres, introducidos en un fragmento recombinante del anticuerpo de interés, por ejemplo fragmentos Fab' o scFv con un residuo de cisteína adicional, o liberarse después de la hidrólisis enzimática del anticuerpo de interés y reducción controlada, el cual es el caso, por ejemplo, durante la preparación de fragmentos Fab' de anticuerpos completos. Anticuerpos completos pueden acoplarse también, luego de la oxidación controlada de los oligosacáridos portados por las cadenas pesadas, a lípidos o lípidos-PEG que exhiben grupos amina o hidrazida libres.

Puesto que las células tumorales que sobre-expresan, o con una activación anormal de, el R-híbrido o ambos, el R-híbrido y el IGF-IR, poseen generalmente la propiedad de sobre-expresar igualmente EGFR, podría probarse también que es ventajoso reivindicar inmunoliposomas bi-específicos para reconocer el R-híbrido o ambos, el R-híbrido y el IGF-IR, con el EGFR. Análogamente, liposomas monoespecíficos en cuya superficie se injertaría uno de los ligandos nativos para estos tres receptores, IGF1, IGF2, insulina o EGF, o liposomas bi-específicos, harían posible reconocer las mismas células tumorales que sobre-expresan, o con una activación anormal de, por lo menos uno de estos receptores. Este enfoque se ha descrito para el EGFR (Kullberg E.B. et al., Pharm. Res., 20:229-236, 2003) pero no para el R-híbrido o ambos, el R-híbrido y el IGF-IR.

Tales inmunoliposomas con anticuerpos anti-R-híbrido o ambos, anti-R-híbrido y anti-IGR-IR, o sus fragmentos, unidos covalentemente a la superficie de los liposomas, están cubiertos en la presente invención.

El método para el tratamiento de cáncer en donde tales inmunoliposomas se administran a un paciente necesitado de dicho tratamiento, forma parte asimismo de la presente invención.

Con el fin de facilitar el acoplamiento entre dicho agente citotóxico y dicho anticuerpo de acuerdo con la invención, es especialmente posible introducir moléculas espaciadoras entre los dos compuestos a acoplarse, tales como poli(alquilen)glicols como polietilen glicol, u otros aminoácidos, o, en otra incorporación, usar derivados activos de dichos

agentes citotóxicos, en los cuales se habrían introducido funciones capaces de reaccionar con dicho anticuerpo de acuerdo con la invención. Estas técnicas de acoplamiento son bien conocidas por el experto en el arte y no se ampliarán en la presente descripción.

En otra incorporación preferida, dicho inhibidor de la actividad tirosina cinasa de los receptores para IGF1 y/o para EGF se selecciona del grupo conformado por agentes naturales derivados, dianilino-ftalimidas, pirazolo- o pirrolopiridopirimidinas u otras quinazilinas. Tales agentes inhibidores son bien conocidos por la persona experta en el arte y se describen en la literatura (Ciardiello F., Drugs 2000, Suppl. 1, 25-32).

Otros inhibidores de EGFR, sin limitación de ninguna clase, constan de anticuerpos monoclonal anti-EGFR C225 y 22Mab (ImClone Systems Incorporated), ABX-EGF (Abgenix/Cell Genesys), EMD-7200 (Merck KgaA) o los compuestos ZD-1834, ZD-1838 y ZD-1839 (AstraZeneca), PKI-166 (Novartis), PKI-166/CGP-75166 (Novartis), PTK 787 (Novartis), CP 701 (Cephalon), leflunomida (Pharmacia/Sugen), CI-1033 (Warner-Lambert Parke-Davis), CI-1033/PD 183,805 (Warner-Lambert Parke-Davis), CL-387, 785 (Wyeth-Ayerst), BBR-1611 (Boehringer Mannheim GmbH/Roche), Naamidina A (Bristol-Myers Squibb), RC-3940-II (Pharmacia), BIBX- 1382 (Boehringer Ingelheim), OLX-103 (Merck & Co), VRCTC-310 (Ventech Research), toxina de fusión EGF (Seragen Inc.), DAB-389 (Seragen/Lilgand), ZM-252808 (Imperial Cancer Research Fund), RG-50864 (INSERM), LFM-A12 (Parker Hughes Cancer Center), WHI-P97 (Parker Hughes Cancer Center), GW-282974 (Glaxo), KT-8391 (Kyowa Hakko) o la "Vacuna EGFR" (York Medical/Centro de Inmunologia Molecular).

De acuerdo con todavía otra incorporación de la invención, la composición, tal como ya se describió, puede comprender igualmente otro compuesto de anticuerpo dirigido contra el dominio extracelular del receptor HER2/neu, como un producto de combinación para empleo simultáneo, separado o consecutivo, destinado a la prevención o para el tratamiento de cáncer, especialmente las neoplasias malignas que sobre-

expresan dicho receptor HER2/neu y el receptor IGF-IR y/o EGFR, tal como especialmente cáncer de la mama.

Puede hacerse referencia especialmente a las publicaciones de Albanell et al. (J. of the National Cancer Institute, 93(24):1830-1831, 2001) y de Lu et al. (J. of the National Cancer Institute, 93(24):1852-1857, 2001) que justifican el inesperado interés en combinar un anticuerpo anti-HER2/neu con un anticuerpo anti-R-híbrido o ambos, anti-R-híbrido y anti-IGF-IR de acuerdo con la presente invención.

En una manera particular, dicho anticuerpo anti-HER2/neu de la composición de acuerdo con la invención es el anticuerpo denominado Trastuzumab (también llamado Herceptina).

La invención se relaciona, en otro aspecto, con una composición caracteriza porque uno, por lo menos, de dichos anticuerpos, o uno de sus fragmentos funcionales, se conjuga con una toxina celular y/o un radioelemento.

Preferiblemente, dicha toxina o dicho radioelemento es capaz de inhibir por lo menos una actividad celular de células que expresan, o con una activación anormal de, el R-híbrido o ambos, el R-híbrido y el IGF-IR y/o EGFR, capaz en una manera más preferida de prevenir el crecimiento o la proliferación de dicha célula, en especial, de inactivar totalmente dicha célula.

Preferiblemente también, dicha toxina es una toxina enterobacteriana, especialmente la exotoxina A de Pseudomonas.

Los radioelementos (o radioisótopos) preferiblemente conjugados a los anticuerpos empleados para la terapia son radioisótopos que emiten rayos gamma y, preferiblemente, yodo^{131}, itrio^{90}, oro^{199}, paladio^{100}, cobre^{67}, bismuto^{217} y antimonio^{211}. Los radioisótopos que emiten rayos beta y alfa pueden usarse igualmente para la terapia.

Por toxina o radioelemento conjugado a por lo menos un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la invención, se quiere indicar cualquier medio que permita que dicha toxina o dicho radioelemento se una a dicho por lo menos un anticuerpo, especialmente por acoplamiento

covalente entre los dos compuestos, con o sin la introducción de una molécula enlazante.

Entre los agentes que permiten la unión en una manera química (covalente), electrostática o no covalente de la totalidad o parte de los componentes del conjugado, pueden mencionarse particularmente la benzoquinona, carbodiimida y, más particularmente, EDC (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]-carbodiimida clorhidrato), dimaleimida, ácido ditiobis-nitrobenzoico (DTNB), N-succinimidil S-acetil tio-acetato (SATA), los agentes puente con uno o más grupos fenilazida que reaccionan con los ultravioletas (U.V.) y, preferiblemente, N-[-4- (azidosalicilamino)butil]-3'-(2'-piridilditio)-propionamida (APDP), N-succinimid-il 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), 6-hidrazino- nicotinamida (HYNIC).

Otra forma de acoplar, especialmente para los radioelementos, puede consistir en el uso de un quelante iónico bi-funcional.

Entre estos quelatos, es posible mencionar el quelato derivado de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) o de DTPA (ácido dietilentriaminapentaacético), que se han desarrollado para unir metales, especialmente metales radioactivos, e inmunoglobulinas. Por consiguiente, DTPA y sus derivados pueden sustituirse por diferentes grupos en la cadena carbono con el fin de aumentar la estabilidad y la rigidez del complejo ligando-metal (Krejcarek et al., 1977; Brechbiel et al., 1991; Gansow, 1991; Patente de los Estados Unidos 4,831,175).

Por ejemplo el ácido dietilentriaminipentaacético (DTPA) y sus derivados, los cuales se han usado ampliamente en medicina y en biología durante largo tiempo en su forma libre, o en la forma de un complejo con un ión metálico, tienen la característica notable de formar quelatos estables con iones metálicos y de acoplarse con proteínas de interés terapéutico o diagnóstico tales como anticuerpos para el desarrollo de radioinmunoconjugados en terapia contra el cáncer (Meases et al., 1984; Gansow et al., 1990).

Preferiblemente, del mismo modo, dicho por lo menos un anticuerpo, que forma dicho conjugado de acuerdo con la invención, se selecciona de

sus fragmentos funcionales, especialmente los fragmentos amputados de su componente Fc tal como los fragmentos scFv.

Por otra parte, la presente invención comprende el uso de la composición de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento.

Más particularmente, de acuerdo con otra incorporación, la invención concierne al uso de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, y/o de una composición para la preparación de un medicamento destinado a la prevención o para el tratamiento de una enfermedad inducida por una sobre-expresión y/o una activación anormal del R-híbrido y/o EGFR, y/o conectada con una hiperactivación de la ruta de transducción de la señal mediada por la interacción de los ligandos nativos de estos receptores, preferiblemente de IGF1, IGF2 o insulina con R-híbrido, y/o de EGF con EGFR y/o HER2/neu.

De acuerdo con otra incorporación, la invención concierne al uso de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, y/o de una composición para la preparación de un medicamento destinado a la prevención o para el tratamiento de una enfermedad inducida por una sobre-expresión y/o una activación anormal de ambos, el R-híbrido y el IGF-IR y/o EGFR, y/o conectada con una hiperactivación de la ruta de transducción de la señal mediada por la interacción de los ligandos nativos de estos receptores, preferiblemente de IGF1, IGF2 o insulina con R-híbrido, de IGF1 ó IGF2 con IGF-IR y/o de EGF con EGFR y/o HER2/neu.

En la presente especificación, por el objeto de la invención "uso de un producto o una composición para la preparación de un medicamento destinado a la prevención o para el tratamiento de una enfermedad", se incluye también "un método de prevención o tratamiento de tal enfermedad, que comprende la administración de dicho producto o composición en un paciente necesitado de dicho tratamiento".

Preferiblemente, dicho uso de acuerdo con la invención se caracteriza porque la administración de dicho medicamento no induce, o induce sólo levemente, efectos secundarios asociados con la inhibición del IR, es decir,

inhibición de la interacción del IR con sus ligandos naturales debido a la presencia de dicho medicamento, especialmente por una inhibición competitiva conectada con la unión de dicho medicamento al IR.

Por otra parte, la presente invención comprende el uso de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, preferiblemente humanizado, y/o de una composición de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento destinado a inhibir la transformación de células normales en células con carácter tumoral, preferiblemente células dependientes de IGF, especialmente dependientes de IGF1- y/o IGF2-, y/o dependientes de EGF y/o dependientes de HER2/neu.

De igual modo, la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, preferiblemente humanizado, y/o de una composición de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento destinado a inhibir el crecimiento y/o la proliferación de células tumorales, preferiblemente células dependientes de IGF, especialmente dependientes de IGF1 y/o dependientes de IGF2, y/o dependientes de EGF y/o dependientes de estrógeno, y/o dependientes de HER2/neu.

En una manera general, un objeto de la presente invención es el uso de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, preferiblemente humanizado, y/o de una composición de acuerdo con la invención, para la preparación de un medicamento destinado a la prevención o el tratamiento de cáncer que expresa preferiblemente, o con una activación anormal de, R-híbrido, o ambos, R-híbrido e IGF-IR, y/o EGFR, y/o de cáncer que tiene preferiblemente una hiperactivación de la ruta de transducción de la señal mediada por la interacción entre el R-híbrido y sus ligandos nativos, preferiblemente IGF1, IGF2 e insulina y/o IGF-IR y sus ligandos nativos, preferiblemente IGF1 e IGF2 o, por ejemplo, la sobre expresión de IRS1 y/o entre EGFR con su ligando nativo, preferiblemente EGF.

El objeto de la presente invención es asimismo el uso de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, preferiblemente humanizado, y/o de una composición de acuerdo con la invención, para la

preparación de un medicamento destinado a la prevención o al tratamiento de psoriasis, psoriasis cuya hiperproliferación epidérmica puede asociarse con la expresión o la sobre-expresión del R-híbrido, o de ambos, el R-híbrido y el IGF-IR, y/o EGFR, y/o con la hiperactivación de la ruta de transducción de la señal mediada por la interacción de R-híbrido o ambos, R-híbrido e IGF-IR respectivamente con sus ligandos naturales (Wraight C.J. et al., Nat. Biotechnol., 2000, 18(5):521-526, Reversal of epidermal hyperproliferation in psoriasis by insulin-like growth factor I receptor antisense oligonucleotides) y/o de EGFR con sus ligandos naturales.

Entre las neoplasias malignas que pueden prevenirse y/o tratarse con el anticuerpo de acuerdo con la invención y capaz de unir (o inhibir actividad tirosina cinasa) el R-híbrido, se prefieren el cáncer de mama y el cáncer de tiroides, o cualquier otro cáncer que sobre exprese, o con una activación anormal de, R-híbrido.

Entre las neoplasias malignas que pueden prevenirse y/o tratarse con el anticuerpo de acuerdo con la invención y capaz de unir (o inhibir actividad tirosina cinasa) ambos, el R-híbrido e IGF-IR, se prefieren el cáncer de próstata, osteosarcomas, cáncer pulmonar, cáncer de mama, cáncer endometrial, cáncer pancreático, cáncer mieloide, cáncer de vejiga, cáncer de tiroides, melanoma o cáncer colorectal o cualquier otro cáncer que sobre exprese, o con una activación anormal de, ambos, el R-híbrido e IGF-IR.

De acuerdo con todavía otro aspecto, un objeto de la presente invención es un método de diagnóstico, preferiblemente *in vitro*, de enfermedades asociadas con una sobre-expresión o una subexpresión, preferiblemente una sobre-expresión, del R-híbrido y/o EGFR a partir de una muestra biológica, en la cual se sospecha la presencia anormal del R-híbrido y/o EGFR, caracterizado porque dicha muestra biológica se pone en contacto con un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la invención, siendo posible, si es necesario marcar dicho anticuerpo.

En todavía otro aspecto, un objeto de la presente invención es un método de diagnóstico, preferiblemente *in vitro*, de enfermedades asociadas con una sobre-expresión o una subexpresión, preferiblemente una sobre-expresión, de ambos, el R-híbrido y el IGF-IR, y/o EGFR a partir de una muestra biológica, en la cual se sospecha la presencia anormal de ambos, el R-híbrido e IGF-IR, y/o EGFR, caracterizado porque dicha muestra biológica se pone en contacto con un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la invención, siendo posible, si es necesario marcar dicho anticuerpo.

Preferiblemente, dichas enfermedades asociadas con la sobre expresión, o con una activación anormal de, el R-híbrido o ambos, el R-híbrido y el IGF-IR y/o EGFR en dicho método de diagnóstico serán neoplasias malignas.

Dicho anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, puede estar presente en la forma de un inmunoconjugado o de un anticuerpo marcado, con el fin de obtener una señal detectable y/o cuantificable.

Los anticuerpos marcados de acuerdo con la invención, o sus fragmentos funcionales, incluyen, por ejemplo, anticuerpos denominados inmunoconjugados, los cuales pueden conjugarse, por ejemplo, con enzimas tales como peroxidasa, fosfatasa alcalina, α-D-galactosidasa, glucosa oxidasa, glucosa amilasa, anhidrasa carbónica, acetilcolinesterasa, lisoenzima, malato dehidrogenasa o glucosa 6-fosfato dehidrogenasa, o por una molécula tal como biotina, digoxigenina o 5-bromodeoxiuridina. Marcas fluorescentes pueden conjugarse igualmente con los anticuerpos o con sus fragmentos funcionales de acuerdo con la invención y, especialmente, incluyen fluoresceína y sus derivados, fluorocromo, rodamina y sus derivados, GFP (GFP "Proteína Fluorescente Verde"), dansilo, umbeliferona, etc. En tales conjugados, los anticuerpos de la invención, o sus fragmentos funcionales, pueden prepararse por métodos conocidos por el experto en el arte. Pueden acoplarse a las enzimas o a las marcas fluorescentes directamente o por el intermediario de un grupo espaciador o de un grupo enlazante tal como un polialdehído, como

glutaraldehído, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilen-triaminopentaacético (DPTA), o en la presencia de agentes de acoplamiento tales como los ya mencionados para los conjugados terapéuticos. Los conjugados que contienen marcas de tipo fluoresceína pueden prepararse por reacción con un isotiocianato.

Otros conjugados pueden incluir asimismo marcas quimioluminiscentes tales como luminol y los dioxetanos, marcas bio-luminescentes tales como luciferasa y luciferina, u otras marcas radioactivas tales como yodo^{123}, yodo^{125}, yodo^{126}, yodo^{133}, bromo^{77}, tecnecio^{99m}, indio^{111}, indio^{113m}, galio^{67}, galio^{68}, rutenio^{95}, rutenio^{97}, rutenio^{103}, rutenio^{105}, mercurio^{107}, mercurio^{203}, renio^{99m}, renio^{101}, renio^{105}, escandio^{47}, telurio^{21m}, telurio^{122m}, telurio^{125m}, tulio^{165}, tulio^{167}, tulio^{168}, flúor^{18}, itrio^{199}, yodo^{131}. Los métodos existentes, conocidos por el experto en el arte, para acoplar los radioisótopos terapéuticos a los anticuerpos ya sea directamente o por medio de un agente quelante tal como EDTA, DTPA, ya mencionados, pueden emplearse para los radioelementos susceptibles de utilizarse en el diagnóstico. Es también posible mencionar la marcación con Na[I^{125}] por el método de cloramina T [Hunter W.M. and Greenwood F.C. (1962) Nature 194:495] o además con tecnecio^{99m} por la técnica de Crockford *et al.* (Patente de los Estados Unidos 4,424, 200) o unida mediante DTPA como se describe por Hnatowich (Patente de los Estados Unidos 4,479, 930).

Por consiguiente, los anticuerpos, o sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la invención pueden emplearse en un proceso para la detección y/o la cuantificación de una sobre-expresión o de una subexpresión, preferiblemente una sobre-expresión, o con una activación anormal, del IGF-IR y/o R-híbrido y/o EGFR en una muestra biológica, caracterizado porque comprende los siguientes pasos:

a) el contacto de la muestra biológica con un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la invención; y

b) la demostración del R-híbrido, o ambos, R-híbrido e IGF-IR, y/o el complejo EGFR/anticuerpo posiblemente formado.

En una incorporación particular, los anticuerpos, o sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la invención, pueden emplearse en un proceso para la detección y/o la cuantificación del R-híbrido, o de ambos, el R-híbrido y el IGF-IR, y/o EGFR en una muestra biológica, para el monitoreo de la eficacia de un tratamiento profiláctico y/o terapéutico de cáncer dependiente de IGF y/o EGF o, además, de psoriasis.

Más generalmente, los anticuerpos, o sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la invención pueden emplearse ventajosamente en cualquier situación donde la expresión, o con una activación anormal, del R-híbrido, o ambos, el R-híbrido e IGF-IR, y/o EGFR tiene que observarse en una manera cualitativa y/o cuantitativa.

Preferiblemente, la muestra biológica se forma de fluido biológico, tal como suero, sangre entera, células, una muestra de tejido o biopsias de origen humano.

Cualquier procedimiento o prueba convencional puede emplearse con el fin de llevar a cabo tal detección y/o dosificación. Dicha prueba puede ser una prueba de competición o sandwich, o cualquier prueba conocida por el experto en el arte, dependiente de la formación de un complejo inmunitario de tipo anticuerpo-antígeno. Siguiendo las aplicaciones de acuerdo con la invención, el anticuerpo o uno de sus fragmentos funcionales pueden inmovilizarse o marcarse. Esta inmovilización puede llevarse a cabo en numerosos soportes conocidos por el experto en el arte. Estos soportes pueden incluir especialmente vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrina, nailon, o células naturales o modificadas. Estos soportes pueden ser solubles o insolubles.

A modo de ejemplo, un método preferido pone en juego procesos inmunoenzimáticos de acuerdo con la técnica ELISA, por técnica de inmunofluorescencia, o radio-inmunoensayo (RIA) o equivalente.

Por consiguiente, la presente invención comprende asimismo los kits o juegos necesarios para llevar a cabo un método de diagnóstico de enfermedades inducidas por una sobre-expresión o una subexpresión del R-híbrido y/o EGFR o para realizar un proceso para la detección y/o la

cuantificación de una sobre-expresión o una subexpresión del R-híbrido y/o EGFR en una muestra biológica, preferiblemente una sobre-expresión, o con una activación anormal, de dicho(s) receptor(es), caracterizado porque dicho kit o juego comprende los siguientes elementos:

a) un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la invención;

b) en forma opcional, los reactivos para la formación del medio favorable a la reacción inmunológica;

c) en forma opcional, los reactivos que permiten la demostración de R-híbrido y/o complejos EGFR/anticuerpo producidos por la reacción inmunológica.

En un segundo aspecto, la invención comprende igualmente los kits o juegos necesarios para llevar a cabo un método de diagnóstico enfermedades inducidas por una sobre-expresión o una subexpresión de ambos, el R-híbrido y el IGF-IR, y/o EGFR o para llevar a cabo un proceso para la detección y/o la cuantificación de una sobre-expresión o de una subexpresión de ambos, el R-híbrido y el IGF-IR, y/o EGFR en una muestra biológica, preferiblemente una sobre-expresión, o con una activación anormal, de dicho(s) receptor(es), caracterizado porque dicho kit o juego comprende los siguientes elementos:

a) un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la invención;

b) en forma opcional, los reactivos para la formación del medio favorable a la reacción inmunológica;

c) en forma opcional, los reactivos que permiten la demostración de anticuerpo R-híbrido/IGF-IR y/o complejos de EGFR/anticuerpo producidos por la reacción inmunológica.

Por otra parte, la invención se refiere al uso de una composición como un producto de combinación de acuerdo con la invención, para la preparación de un medicamento destinado a la prevención o al tratamiento

de cáncer, especialmente neoplasias malignas para las cuales se prescribe generalmente dicho agente citotóxico o dicho anticuerpo anti-HER2/neu y, especialmente, para aquellas neoplasias cuyas células tumorales expresan o sobre-expresan el IGF-IR y/o EGFR.

Un objeto de la invención es por lo demás el uso de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento destinado al direccionamiento específico (***"the specific targeting"***) de un compuesto biológicamente activo a células que expresan o sobre-expresan el R-híbrido o ambos, el R-híbrido y el IGF-IR y/o EGFR.

Por un compuesto biológicamente activo se quiere indicar aquí cualquier compuesto capaz de modular, especialmente de inhibir, actividad celular, en particular su crecimiento, su proliferación, transcripción o traducción génica.

Un objeto de la invención es además un reactivo diagnóstico *in vivo* que comprende un anticuerpo de acuerdo con la invención, o uno de sus fragmentos funcionales, preferiblemente marcado, especialmente radiomarcado, y su uso en radiografía médica, en particular para la detección de cáncer asociado con la expresión o la sobre-expresión por una célula del R-híbrido, o ambos, el R-híbrido y el IGF-IR, y/o EGFR.

La invención se refiere igualmente a una composición como un producto de combinación o a un anti-R-híbrido, o ambos, anti-R-híbrido y anti-IGF-IR, y/o conjugado EGFR/toxina o radioelemento, de acuerdo con la invención, como un medicamento.

Preferiblemente, dicha composición como un producto de combinación o dicho conjugado de acuerdo con la invención se mezclará con un excipiente y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En la presente descripción, vehículo farmacéuticamente aceptable quiere indicar un compuesto o una combinación de compuestos, que se incorporan en una composición farmacéutica sin provocar reacciones secundarias, y que permiten, por ejemplo, facilitar la administración del compuesto(s) activo, un aumento en su expectativa de vida y/o en su eficacia en el cuerpo, un incremento en su solubilidad en solución o,

además, una mejora en su conservación. Estos vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos y se adaptarán por el experto en el arte como una función de la naturaleza y del modo de administración del compuesto(s) activo seleccionado.

Preferiblemente, estos compuestos se administrarán por la vía sistémica, en particular por la vía intravenosa, por la vía intramuscular, intradérmica, intraperitoneal o subcutánea, o por la vía oral. En una manera más preferida, la composición que comprende los anticuerpos de acuerdo con la invención se administrará varias veces, en una forma consecutiva.

Sus modos de administración, posologías y formulaciones farmacéuticas óptimas pueden determinarse de acuerdo con los criterios tomados generalmente en cuenta al establecer un tratamiento adaptado a un paciente tales como, por ejemplo, la edad y el peso corporal del paciente, la gravedad de su estado general, la tolerancia al tratamiento y los efectos secundarios observados.

El anticuerpo, o sus fragmentos, podrían emplearse solos o en asociación con otro anticuerpo capaz de reconocer otro factor de crecimiento implicado en la proliferación o diseminación de células tumorales. Podría empelarse también en asociación con un agente quimioterapéutico u otro inhibidor de tirosina cinasa en co-administración o en la forma de un inmmunoconjugado, siendo dicho agente químico, biológico y/o natural. Asimismo podrían usarse fragmentos de dicho anticuerpo en anticuerpos bi-específicos obtenidos por mecanismos recombinantes o acoplamiento bioquímico, y luego asociando la especificidad del anticuerpo ya descrito con la especificidad de otros anticuerpos capaces de reconocer otros receptores involucrados en la proliferación, la angiogénesis o cualesquiera otros mecanismos implicados en el desarrollo tumoral.

Un aspecto particular de la presente invención es un agente activo citotóxico y/o citostático acoplado a un sistema de direccionamiento, particularmente a los anticuerpos 7C10, C7C10 ó h7C10, o su fragmento,

de acuerdo con la presente invención capaz de unirse específicamente al R-híbrido o ambos, el R-híbrido y el IGF-IR.

La presente invención se relaciona además con compuestos novedosos que comprenden un agente activo citotóxico y/o citostático acoplado a un sistema de direccionamiento. Más particularmente, la presente invención se refiere a un compuesto que comprende un alcaloide vinca acoplado a un anticuerpo capaz de unirse específicamente al R-híbrido o ambos, el R-híbrido y el IGF-IR y/o capaz de inhibir específicamente la actividad tirosina cinasa de dicho R-híbrido o ambos, R-híbrido e IGF-IR, en particular un anticuerpo monoclonal de origen murino, quimérico, primatizado, humanizado y humano. La invención se refiere igualmente al modo de acoplar los elementos de dicho compuesto y, por otra parte, comprende el uso de estos compuestos como un producto medicinal para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico de cáncer, más particularmente de neoplasias malignas que sobre-expresan R-híbrido y/o IGF-IR, o de cualquier estado patológico asociado con la sobre-expresión, o con una activación anormal, de dicho receptor(es).

En la actualidad, junto con la cirugía y la radioterapia, la quimioterapia representa uno de los medios más efectivos de combatir el cáncer. Se han aislado o sintetizado muchos agentes citotóxicos y/o citostáticos que han hecho posible destruir o reducir, si no definitiva, por lo menos significativamente, las células tumorales. No obstante, la actividad tóxica de estos agentes no se limita a las células tumorales, afectándose y pudiéndose destruir también las células no tumorales. Más particularmente, se observan efectos secundarios en células que se renuevan con rapidez, tales como las células hematopoyéticas o células del epitelio, en particular de las membranas mucosas. A modo de ilustración, las células de tubo digestivo son ampliamente afectadas por el uso de agentes citotóxicos.

Una de los objetivos de la presente invención es asimismo poder proporcionar un compuesto que haga posible limitar los efectos secundarios sobre las células normales, conservando al mismo tiempo una elevada citotoxicidad sobre las células tumorales.

De acuerdo con un enfoque original, el solicitante, en lugar de desarrollar nuevas moléculas, ha buscado superar el problema de la toxicidad de moléculas conocidas limitando a las células tumorales el acceso de dichas moléculas. Para realizar esto, el solicitante ha desarrollado un sistema de direccionamiento tipo anticuerpo para reconocer únicamente células tumorales.

Una de las ventajas de este enfoque es estar en capacidad de utilizar agentes citotóxicos conocidos que son bien definidos en términos farmacológicos y farmacocinéticos. Además, es posible entonces usar agentes citotóxicos fuertes que hasta ahora se han desechado a favor de agentes citotóxicos que son menos fuertes pero que tienen un mejor índice terapéutico (y, por lo tanto, exhiben menores efectos secundarios).

Otra ventaja radica en el uso de un anticuerpo, es decir, de un producto de origen biológico, que no agrega ninguna toxicidad a la del agente citotóxico. Adicionalmente, como se expondrá a continuación, la selección del anticuerpo permite acumular con la acción del agente citotóxico su propia actividad biológica.

El solicitante ha demostrado que el uso de un alcaloide vinca acoplado al dispositivo de direccionamiento es útil en quimioterapia.

De acuerdo con un primer aspecto, un objeto de la presente invención es un compuesto que comprende por lo menos una molécula de agente activo acoplada al sistema de direccionamiento, siendo dicha por lo menos una molécula de agente activo un compuesto citotóxico y/o citostático fuerte seleccionado de alcaloides vinca, y siendo dicho sistema de direccionamiento un anticuerpo policlonal o monoclonal, que puede ser bi-específico, o su fragmento funcional, capaz de reconocer, preferiblemente específicamente, células tumorales.

Una ventaja de un compuesto de acuerdo con la invención es que el agente activo se lleva directamente a las células diana por el anticuerpo y, además del hecho que no degrada las otras células, no se disminuye su actividad biológica.

Una de las ventajas asociadas con emplear anticuerpos como un sistema de direccionamiento es que es posible acoplar varios agentes activos a ellos, aumentando en esa forma la eficacia del compuesto. Específicamente, puesto que el compuesto se lleva directamente a las células diana, el hecho de que hay varios agentes activos no conducirá a un aumento en los efectos secundarios, sino sólo a un incremento en el efecto deseado ***in situ*** sobre las células tumorales.

A modo de ejemplos no limitantes de direccionar anticuerpos que pueden usarse de acuerdo con la invención, puede hacerse mención, sin limitación de ninguna clase, de los anticuerpos CeaVac anticuerpos dirigidos contra células tumorales colorrectales, y los anticuerpos Y Theragyn/pemtumomab y OvaRex dirigidos contra células tumorales ováricas.

La presente invención se relaciona con un compuesto como se describe más arriba, que comprende de 1 a 50 moléculas de agente activo, preferiblemente de 1 a 10 y, todavía mejor, de 1 a 6. La elección del número de moléculas de agente activo depende, entre otros, del peso molecular de cada uno de los elementos. Por ejemplo, a modo de indicación, para un anticuerpo del tipo IgG1 con un peso molecular de 150.000 Da, se prefiere acoplar de 4 a 6 moléculas de vinblastina con un peso molecular de 900 Da (Petersen et al., Cancer Res., 1991, 51:2286). Si el anticuerpo se conjuga con una cantidad muy grande de agentes citotóxicos, existe un riesgo de que dichos agentes enmascaren el sitio de reconocimiento para el antígeno y disminuyan su actividad.

En la práctica, el compuesto que es objeto de la invención se utiliza como un producto medicinal y, más particularmente, como un producto medicinal previsto para el tratamiento del cáncer.

La presente invención difiere del arte previo no sólo en el sentido de que la elección del anticuerpo se orienta a reconocer células tumorales, como ya se describió, sino también en que dicho anticuerpo exhibe una actividad intrínseca sobre las células tumorales.

De acuerdo con otra incorporación de la invención, el compuesto como ya se describió es también capaz de inhibir la proliferación de las células tumorales y/o restauración de la función apoptótica bloqueando las señales de transducción, la evolución de las células en el ciclo celular y/o disponibilidad de receptor ligado a la membrana (fenómenos de internalización y degradación de dicho receptor), o de revertir un fenotipo resistente a la apoptosis en el caso de un anticuerpo dirigido contra el IGF-IR, en la medida en que se describe ampliamente que la sobre-expresión de este receptor confiere a las células tumorales un medio de resistir la apoptosis y, en particular, apoptosis inducida por compuestos de quimioterapia (Beech D. J. et al., Oncology reports, 2001, 8:325-329; Grothe A. et al., J. Cancer Res. clin Oncol., 1999, 125:166-173). Otro mecanismo de acción del compuesto, como se describe anteriormente, puede asociarse con la porción Fc del anticuerpo, si se utiliza un anticuerpo entero, y puede consistir en el establecimiento de mecanismos efectores tales como ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo) y CDC (citotoxicidad dependiente de complemento).

A modo de ejemplo no limitante de anticuerpos, puede hacerse mención de Avastina/Bevacizumab que actúa en neoplasias malignas colorrectales interfiriendo la angiogénesis del tumor, Rituxan/rituximab, cuya actividad se relaciona principalmente con las funciones efectoras de la molécula y, en particular ADCC, y también Herceptina/trastuzumab que actúa por inhibición de la transducción de señales e inhibición de la evolución celular en el ciclo celular y, además, en gran parte, iniciando mecanismos ADCC.

Los alcaloides vinca corresponden a la familia de compuestos naturales de los cuales vinblastina, vincristina, anhidrovinblastina y leurosina, que se hallan presentes en cantidades considerables en plantas, son ejemplos demostrativos.

Por lo tanto, el término "alcaloides vinca" debe entenderse para significar todos los derivados presentes en pequeñas cantidades, tales como deoxivinblastina o leurosidina, tomadas a modo de ejemplos no limitantes.

Debe entenderse asimismo para significar derivados de estructura natural, pero que se obtienen por síntesis, tales como, sin limitación de ninguna clase, anhidrovinblastina.

El término "alcaloide vinca" debe entenderse igualmente para significar todos los compuestos derivados de estos compuestos naturales por modificación química o bioquímica en uno o más pasos. Estas modificaciones pueden afectar el componente "vindolina" o el componente "velbanamina" o ambos componentes simultáneamente. Los alcaloides vinca, como tales, son conocidos por los expertos en el arte (Antitumor Bisindole Alkaloids from Catharanthus roseus (L.)). The Alkaloids, Brossi A. et al., M. Ed. Academic Press Inc. San Diego, vol. 37, 1990; Jacquesy J.C. et al., Biomedical Chemistry: Applying Chemical Principles to the Understanding and Treatment of Disease, edited by Torrence, P.F., John Wiley and Sons Inc.: New York, 2000, pp. 227-246; Fahy J. et al., J. Current Phann. Des., 2001, 7:1181-97; Duflos A. et al., Novel Aspects of Natural and Modified Vinca Alkaloids, Curr. Med. Chem. -Anti-Cancer Agents, 2002, 2:55-70).

Los derivados preferidos de acuerdo con la presente invención son aquellos que exhiben una ventaja farmacológica establecida en virtud de ensayos de citotoxicidad o ensayos de actividad en ciertas dianas específicas, tales como tubulina, o que han demostrado ventajas en pruebas *in vivo* con animales. Entre estos compuestos, puede hacerse mención de los derivados utilizados en la actualidad en quimioterapia anti-cáncer: vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina, y además los derivados que han demostrado una ventaja en estudios clínicos, tales como vinepidina, vinfosiltina, vinzolidina y vinflunina.

Por consiguiente, la invención se basa parcialmente en la elección de una agente citotóxico original sin ninguna desviación del arte previo.

Más particularmente, un objeto de la presente invención es un compuesto como ya se describió, en el cual dicho alcaloide vinca se selecciona de vinblastina, deoxivinblastina, deoxileurosidina, vincristina, vindesina, vinorelbina, vinepidina, vinfosiltina, vinzolidina y vinflunina.

Más específicamente, el objeto de la invención se ha demostrado y ejemplificado usando deoxivinblastina y su isómero 4'-S, conocido comúnmente como deoxileurosidina.

La estructura de cada uno de estos dos compuestos se ha descrito durante muchos años, pero se considera que su actividad farmacológica es moderada o débil (Neuss N. et al., Tetrahedron Letters, 1968, No. 7, pp 783-7; United States Patent 4,143,041, Eli Lilly and Company, Filed Nov. 25, 1977; y recently, Kuehne M. E. et al., J. Org. Chem., 1989, 54, 14:3407-20; Kuehne M. E., Org. Biomol. Chem., 2003 1:2120-36). Su ventaja real como un compuesto con actividad farmacológica anti-tumoral incuestionable no se ha descrito y demostrado nunca en experimentos *in vivo* sobre modelos tumorales murinos.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un compuesto como ya se describió, en el cual dicho alcaloide vincaes (4'-R) deoxivinblastina y/o (4'-S) deoxileurosidina.

La mayor actividad de estos dos derivados se ha demostrado contra leucemia murina P388 injertada intravenosamente el día 0. El compuesto se administra intraperitonealmente en una dosis única el día 1. El protocolo de esta prueba se describe por Kruczynski A. et al., Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 1998, volume 41, pages 437 to 447.

Convencionalmente, la actividad *in vivo* de compuestos citotóxicos se expresa por la T/C con una dosis expresada en mg por kg. La T/C corresponde a la relación, multiplicada por 100, de la media del tiempo de supervivencia de los animales tratados respecto a la media del tiempo de supervivencia de los animales de control.

A modo de ejemplo, para agentes citotóxicos usados hasta la fecha, la actividad máxima de sulfato de vinblastina se expresa como la dosis de 5 mg/kg, con T/C= 143. La actividad máxima del sulfato de vincristina se expresa con las dosis de 1.25 y 2.5 mg/kg, con T/C = 143 en ambos casos.

Inesperadamente, la actividad máxima de ditartrato de deoxivinblastina se expresa con la dosis de 20 mg/kg, con T/C = 214, y la

actividad máxima de ditartrato de deoxileurosidina se expresa con la dosis 2.5 mg/kg, con T/C = 200.

En vista de estos resultados, la presente invención se relaciona por lo tanto con el uso de (4'-R) deoxivinblastina y/o (4'-S) deoxileurosidina, denominada colectivamente deoxivinblastina en el resto de la descripción, para tratar cáncer.

De acuerdo con una forma preferida, como se describe más arriba, la presente invención contempla el acoplamiento de deoxivinblastina a un compuesto del anticuerpo tipo monoclonal o policlonal, preferiblemente monoclonal.

Más particularmente, como se describirá posteriormente, un anticuerpo preferido, que constituye el compuesto que es objeto de la presente invención, es un anticuerpo monoclonal o policlonal, preferiblemente monoclonal, que reconocerá el IGF-IR específicamente y con alta afinidad, y que tendrá la capacidad de inhibir el crecimiento de tumores, más particularmente, de tumores que expresan el IGF-IR.

Las proteína tirosina cinasas citoplásmicas se activan por unión del ligando al dominio extracelular del receptor. La activación de las cinasas lleva, a su vez, a la estimulación de varios sustratos intracelulares, incluidos IRS-1, ISR-2, Shc y Grb 10 (Peruzzi F. et al., J. Cancer Res. Clin. Oncol., 125: 166-173, 1999). Los dos principales sustratos para el IGF-IR son IRS y Shc, que median, por activación de muchos efectores situados corriente abajo, la mayoría de los efectos de crecimiento y diferenciación asociados con la unión de IGFs a este receptor. Por consiguiente, la disponibilidad de sustratos puede dictar el efecto biológico final asociado con la activación del IGF-IR. Cuando IRS-1 predomina, las células tienden a proliferar y transformarse. Cuando Shc domina, las células tienden a diferenciarse (Valentinis B. et al., J. Biol. Chem., 274:12423-12430, 1999). Parece que la ruta principalmente implicada para los efectos de protección contra la apoptosis es la ruta de las fosfatidilinositol 3-cinasas (PI 3-cinasas) (Prisco M. et al., Horm. Metab. Res., 31:80-89, 1999; Peruzzi F. et al., J. Cancer Res. Clin. Oncol., 125:166-173, 1999).

De acuerdo con una incorporación preferida, un objeto de la presente invención es un compuesto como se describe anteriormente (agente activo citotóxico y/o citostático, acoplado a un sistema de direccionamiento), que comprende un anticuerpo capaz de reconocer el IGF-IR específicamente y con alta afinidad. Este anticuerpo interactuará en poca medida, o no interactuará en absoluto con el receptor de insulina IR. Su unión debe inhibir, *in vitro*, el crecimiento de tumores que expresan el IGF-IR interactuando principalmente con las rutas de transducción de señales activadas durante las interacciones IGF1/IGF-IR y IGF2/IGF-IR. Este anticuerpo debe ser activo *in vivo* en todos los tipos de tumores que expresan el IGF-IR, incluidos los tumores de mama dependientes de estrógeno y tumores de próstata, que no es el caso para los anticuerpos monoclonales anti-IGF-IR (designados MAb o MAB) actualmente disponibles. De hecho, αIR3, que es una referencia en el campo IGF-IR, inhibe completamente el crecimiento de tumores de mama dependientes de estrógeno (MCF-7) *in vitro*, pero no tiene efecto en el modelo correspondiente *in vivo* (Artega C. et al., J. Clin. Invest., 84:1418-1423, 1989). Análogamente, el fragmento scFv-Fc derivado del 1H7 monoclonal murino sólo es débilmente activo en el tumor de mama MCF-7 y completamente inactivo en un tumor de próstata independiente de andrógeno (Li S.L. et al., Cancer Immunol. Immunother., 49:243-252, 2000).

De acuerdo con una incorporación preferida, un objeto de la presente invención es un compuesto (agente activo citotóxico y/o citostático, acoplado a un sistema de direccionamiento) como ya se describió, que comprende un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, siendo dicho anticuerpo o uno de sus dichos fragmentos capaces de unirse específicamente al receptor del factor de crecimiento insulinoide tipo I humano IGF-IR y, donde sea apropiado, capaces de inhibir la unión natural de los ligandos IGF-IR IGF1 y/o IGF2, y/o capaces de inhibir específicamente la actividad tirosina cinasa de dicho IGF-IR.

Tal compuesto posee una doble ventaja.

En primer lugar, permite, como ya se describió, llevar el agente citotóxico directamente a las células tumorales, más particularmente células tumorales que sobre-expresan, o con activación anormal de, el R-híbrido o ambos, el R-híbrido y el IGF-IR y, por consiguiente, disminuir los efectos secundarios en células normales.

En segundo, su modo de acción no se limita al reconocimiento ("***targeting***"). El compuesto que es objeto de la presente invención acumula la acción del agente citotóxico, que permite destruir las células tumorales, y la acción del anticuerpo que inhibirá el crecimiento de las células tumorales, preferiblemente de células tumorales que expresan, o con activación anormal de, el R-híbrido o ambos, el R-híbrido y el IGF-IR, interactuando con las rutas de transducción de señales, y hará posible disminuir la resistancia a apoptosis de células que sobre-expresan el receptor para IGF1 y, por consiguiente, mejorar la actividad de los medicamentos para quimioterapia, parte del mecanismo de acción del cual radica en la inducción de apoptosis.

De acuerdo con una incorporación preferida del compuesto (agente activo citotóxico y/o citostático, acoplado a un sistema de direccionamiento) que es objeto particularmente de la presente invención, el anticuerpo monoclonal, o uno de sus fragmentos funcionales, es el 7C10, un C7C10 o un h7C10, o su fragmento, o sus anticuerpos derivados, como se describe en la primera parte de la presente especificación dirigida a los anticuerpos anti-R-híbrido o ambos, anti-R-híbrido y anti-IGR-IR de la presente invención.

En este respecto, el solicitante presentó una solicitud de Patente Francesa FR 03/08538 el 11 de julio de 2003 para "Novedosos inmunoconjugados antitumorales". El contenido de esta solicitud de patente se incorpora aquí a modo de referencia.

Inmunoliposomas que contienen dichos agentes citotóxicos y/o citostáticos particulares, como los ya descritos, tales como los alcaloides vinca, y que los direccionan a células tumorales por medio de anticuerpos o

de fragmentos de anticuerpo unidos a su superficie, están cubiertos por la presente invención.

Forma parte asimismo de la presente invención un método de tratamiento de cáncer, particularmente las neoplasias malignas preferidas citadas más arriba, que comprende la administración de los presentes inmunoliposomas.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo usados se dirigen contra antígenos sobre-expresados en la superficie de células tumorales y/o antígenos de superficie, cuya expresión se restringe a células tumorales. Éstos se dirigen preferiblemente contra receptores de tirosina cinasa y, más particularmente, contra los receptores para IGF-I, EGF o, además, VEGF. Un anticuerpo preferido es un anticuerpo monoclonal o policlonal, preferiblemente monoclonal, o incluso humanizado, que reconocerá el R-híbrido, o ambos, el R-híbrido y el IGF-IR, específicamente y con alta afinidad. Aún más preferiblemente, este anticuerpo está conformado por el anticuerpo anti-R-híbrido o ambos, anti-R-híbrido y anti-IGR-IR, que es objeto de la presente invención descrito en la primera parte de la especificación.

De acuerdo con otra incorporación del compuesto (agente activo citotóxico y/o citostático, acoplado a un sistema de direccionamiento) que es objeto de la presente invención, el anticuerpo monoclonal, como ya se describió, está también en capacidad de unirse específicamente al receptor de factor de crecimiento epidérmico humano, EGFR, y/o capaz de inhibir específicamente la actividad tirosina cinasa de dicho EGFR.

De acuerdo con un aspecto preferido de esta incorporación del compuesto (agente activo citotóxico y/o citostático, acoplado a un sistema de direccionamiento), el anticuerpo monoclonal acoplado consta de un anticuerpo bi-específico que comprende una segunda unidad que inhibe específicamente la unión de EGF al EGFR y/o que inhibe específicamente la actividad tirosina cinasa de dicho EGFR.

En una incorporación preferida de la invención, el anticuerpo bi-específico que puede usarse aquí para el agente activo citotóxico y/o

citostático, acoplado a un sistema de direccionamiento de acuerdo con esta invención es aquel como se describe en la primera parte de la presente especificación relacionada con anticuerpos bi-específicos de la invención.

Otro aspecto de la invención concierne al modo de acoplamiento entre el anticuerpo y el agente citotóxico. Cualquiera que sea la naturaleza del acoplamiento, que puede ser directo o indirecto, estable o lábil, en ningún modo debe menoscabar las funciones biológicas respectivas del anticuerpo y el agente citotóxico. Se entiende claramente que cualquier acoplamiento que satisfaga esta característica, y conocido por los expertos en el arte, se incluye en el ámbito de la presente solicitud de patente. Adicionalmente, el acoplamiento y, más particularmente, el ligamiento utilizado, tiene que permitir la liberación de la deoxivinblastina, en la forma de ácido 3- ó 4-deacetilado, o en la forma de una de estas formas que llevan la totalidad o parte del dicho ligamiento utilizado, en las células diana.

De acuerdo con una incorporación preferida, el acoplamiento es un acoplamiento químico. Más particularmente, dicho acoplamiento químico se compone de un anclaje en el alcaloide vinca, un anclaje en el anticuerpo y un ligamiento que conecta estos dos anclajes.

El término "ligamiento" debe entenderse para significar cualquier estructura capaz de proporcionar un enlace de cualquier naturaleza posible entre los dos elementos del compuesto, a saber, una molécula química y un anticuerpo.

En términos del anclaje en el alcaloide vinca, se contemplan varias posibilidades. Puede hacerse mención, por ejemplo, de un anclaje en la función alcohol en la posición 4 luego de la deacetilación del grupo 4-acetoxi de dicho alcaloide vinca.

En otra incorporación, el anclaje en el alcaloide vinca en la función ácido en la posición 3 luego de la deacetilación del grupo 4-acetoxi y demetilación de la función éster en la posición 3 de dicho alcaloide vinca.

De acuerdo con todavía otra incorporación de la invención, el anclaje en el alcaloide vinca en la función ácido en la posición 3 directamente por reacción en la función éster en la posición 3 de dicho alcaloide vinca.

309
309

De acuerdo con todavía otra incorporación de la invención, el anclaje en el alcaloide vinca por medio de una función éster o tioéster en la función hidroxilo en la posición 3.

Una incorporación adicional consiste en efectuar el anclaje en el alcaloide vinca por medio de una función amida o una función éster o una función hidrazida en la función ácido en la posición 4.

En lo que respecta al anclaje en el anticuerpo, en ningún modo debe desnaturalizar el anticuerpo, con el fin de no disminuir su capacidad de reconocer e interactuar con células tumorales.

Para hacer esto, es preferible que el anclaje en el anticuerpo se efectúe en los oligosacáridos, las lisinas y/o los residuos de ácido aspártico y ácido glutámico.

El alcaloide vinca puede acoplarse asimismo en las funciones carboxílicas del anticuerpo, portadas por los residuos de ácido aspártico y ácido glutámico del anticuerpo. Por ejemplo, un derivado de amina, hidrazida o hidrazina del alcaloide vinca se acoplará en estos residuos en la presencia de un compuesto del tipo carbodiimida, tal como N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (o EDAC).

En la práctica, es aún más preferible efectuar el anclaje en los oligosacáridos presentes en el anticuerpo. Específicamente, no hay oligosacáridos en los sitios de reconocimiento del anticuerpo y, como resultado, no existe riesgo de arruinar las capacidades de reconocimiento/ actividad biológica de dicho anticuerpo. De acuerdo con una incorporación preferida de la invención, el anclaje se realiza en los oligosacáridos presentes en las asparaginas (Asn) que son seguidas por una secuencia de consenso que consta de un aminoácido y una serina o una treonina. Por ejemplo, sin limitación de ninguna clase, un anclaje preferido en el anticuerpo IgG1 usado en la invención está en Asn297.

También está cubierto un anclaje combinado, es decir, un anclaje en oligosacáridos, lisinas y/o ácido aspártico y ácido glutámico.

Una incorporación adicional consiste en aumentar considerablemente la densidad del alcaloide vinca con el fin de alcanzar 10 a 50 mol por mol

de anticuerpo. Puede hacerse mención del acoplamiento de de un derivado de hemisuccinato del alcaloide vinca en un polímero de lisina (Poly-L-Lys o Poly-D-Lys). El conjugado así obtenido se acopla entonces en los oligosacáridos del anticuerpo, oxidado previamente con meta-periodato.

En otra incorporación, un derivado de hidrazida del alcaloide vinca puede acoplarse en una dextrina oxidada previamente con meta-periodato. El conjugado obtenido se acopla entonces al anticuerpo por medio de los residuos de lisina.

De acuerdo con todavía otra incorporación, un derivado de hemisuccinato del alcaloide vinca puede acoplarse en una dextrina activada previamente por oxidación controlada con meta-periodato y luego sustituida con un compuesto de tipo diamida. El conjugado obtenido se acopla entonces en los residuos de lisina del anticuerpo.

De acuerdo con una incorporación preferida de la invención, el anclaje en el anticuerpo se lleva a cabo por reacción de una función amina, una función hidrazina, una función hidrazida o una función ácido que se ha activado.

Más particularmente, el anclaje en el anticuerpo se efectúa por reacción de una función epóxido o una función disulfuro, una función sulfuro o una función ácido, que se ha activado, con un residuo que contenga nitrógeno, o con un residuo hidroxilo o con un residuo tiol de dicho anticuerpo.

Puede hacerse igualmente mención, en una manera no limitante, de otro ligamientos que pueden usarse asimismo para unir covalentemente los alcaloides vinca a los anticuerpos o a sus fragmentos funcionales (Garnett et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 2001, 171-216), tales como aldehídos, que hacen posible formar bases de Schiff, las cuales pueden estabilizarse entonces por reducción con borohidruro de sodio o cianoborohidruro; disulfuros que poseen la ventaja de poder liberar los alcaloides vinca dentro de la célula tumoral con base en el entorno reductor intracitoplasmático; tioéteres más estables; tioésteres más lábiles; ligamientos que son lábiles en medio ácido, que poseen la ventaja de permitir la liberación del agente

citotóxico en el tumor, el cual es por lo general más ácido, o durante el paso del endosoma (pH 6.0, 6.8) al lisosoma (pH 4.5, 5.5), o también ligamientos degradables por enzima que poseen la ventaja de ser estables en el suero y liberar el agente citotóxico en el medio intracelular de la célula tumoral.

Puede hacerse también mención de secuencias de péptidos del tipo Ala Leu, que pueden segmentarse por hidrolasas lisosómicas (Masquelier et al., J. Med. Chem., 1980, 23:1166-1170) o asimismo ligamientos del tipo hidrazona, tales como los usados en el inmunoconjugado gemtuzumab ozogamicina, empleado en el tratamiento de ciertos tipos de leucemia y comercializados bajo el nombre Mylotarg (Hamann et al., Bioconjugate Chem., 2002, 13:47).

Como se describe más arriba, una forma preferida de la invención emplea un ligamiento que permite la liberación de la deoxivinblastina en las células tumorales.

Un primer medio para lograr esto consiste en utilizar un ligamiento, que conecta los dos anclajes, conformado por una cadena de péptido. De hecho, tal ligamiento de péptido se degradará/hidrolizará en las células diana por las enzimas de los endosomas y los lisosomas.

De acuerdo con otra incorporación de la invención, el ligamiento que conecta los dos anclajes consiste de una cadena, a base de carbono, lineal o ramificada. En el último caso, se contempla que uno o más grupos aromáticos, etilénicos o acetilénicos y, además, uno o más grupos cetona, amida, éster, hidrazida, hidrazona, amina, éter, sulfuro o disulfuro se incluyan en la cadena carbono en una manera distinta o combinada. Por ejemplo, en el caso de una unión mediante un puente disulfuro, es el medio reductor el que permitirá la segmentación del ligamiento y liberación de la deoxivinblastina.

En todos los casos, únicamente el ligamiento se destruye con el fin de liberar el principio activo, permaneciendo dicho principio activo y el anticuerpo en sí mismos intactos.

De acuerdo con todavía otra incorporación, no existe ligamiento, pero el alcaloide vinca se acopla directamente con un residuo que contiene nitrógeno o con un residuo hidroxilo o con un residuo tiol del anticuerpo.

La ventaja de tal acoplamiento directo radica en la ausencia de ligamiento de anclaje y, por consiguiente, en la ausencia de una reacción inmunitaria por el paciente contra este ligamiento. En consecuencia se evita, por ejemplo, la aparición de anticuerpos anti-ligamiento segregados por el cuerpo en respuesta a la intrusión de dicho ligamiento.

Más particularmente, el compuesto de acuerdo con la invención se caracteriza porque la función ácido en la posición 4 del alcaloide vinca se acopla, por medio de una función hidrazida, con un residuo aldehído del anticuerpo, generado previamente.

La invención tiene que ver asimismo con una composición farmacéutica que comprende, como principio activo, un compuesto que incluye o consiste de un alcaloide vinca acoplado a un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, de acuerdo con la invención, al cual se añade preferiblemente un excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención comprende también el uso de un compuesto de acuerdo con la invención para preparar un producto medicinal.

Más particularmente, de acuerdo con otra incorporación, la invención se refiere al uso de un compuesto, como ya se describió, y/o de una composición que comprende tal compuesto, para preparar un producto medicinal destinado a la prevención o tratamiento de neoplasias malignas, en particular neoplasias malignas inducidas por sobre-expresión y/o activación, o con una activación anormal, del R-híbrido, o ambos, el R-híbrido y el IGF-IR, y/o EGFR que es anormal, y/o asociada con la hiperactivación de la ruta de transducción de señales mediada por la interacción de IGF1, IGF2 o insulina con R-híbrido solo o en combinación con la interacción de IGF1 o IGF2 con IGF-IR y/o de EGF con EGFR.

Entre las neoplasias malignas que pueden prevenirse y/o tratarse, se prefieren cáncer de próstata, osteosarcomas, cáncer de pulmón, cáncer de

mama, cáncer del endometrio o cáncer de colon, o cualquier otro cáncer que sobre-exprese IGF-IR.

De acuerdo con otro aspecto, la invención concierne a un anticuerpo anti-IGF-IR humanizado, o su fragmento de unión a antígeno, en donde dicho anticuerpo anti-IGF-IR, o fragmento de unión a antígeno, comprende por lo menos una región determinante complementaria de origen no humano y por lo menos una región marco que tiene por lo menos un residuo humano, en donde dicho anticuerpo se caracteriza por:

a) unir IGF-IR pero no IR solo; y/o

b) inhibir la unión entre un IGF-IR humano y su ligando nativo, designado preferiblemente aquí IGF1 y/o IGF2, con una constante inhibición y/o IC_{50} de menos de 100nM, preferiblemente menos de 50 nM; y/o

c) inhibir específicamente la actividad tirosina cinasa de dicho IGF-IR; y/o

d) poseer una afinidad de unión de 10nM, o menos, para dicho IGF-IR; y/o

e) regular por disminución la expresión de IGF-IR; y/o

f) inhibir *in vivo* el crecimiento tumoral;

en donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que incluye secuencias de aminoácidos FR1, FR2 y FR3 humano, que corresponden a aquellos de una linaje germinal humana tal como, por ejemplo, la linaje germinal humana del subgrupo I(A) Kabat, o sustituciones conservadoras o mutaciones somáticas en ella, y/o en donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que incluye secuencias de aminoácidos FR1, FR2 y FR3 humano que corresponden a las de una linaje germinal humana tal como, por ejemplo, la linaje germinal humana del subgrupo II Kabat, o sustituciones conservadoras o mutaciones somáticas en ella, y en donde las secuencias FR de la cadena pesada se enlazan con CDR1, CDR2 y CDR3 de secuencias derivadas de una fuente no humana y comprenden las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo conformado por SEQ ID No. 8, 10

y 12, y/o en donde las secuencias FR de la cadena liviana se enlazan con CDR1, CDR2 y CDR3 de secuencias derivadas de una fuente no humana y comprenden las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo conformado por SEQ ID No. 2, 4 y 6.

En una segunda incorporación, la presente invención se ocupa igualmente de un anticuerpo anti-R-híbrido humanizado o su fragmento de unión a antígeno, en donde dicho anticuerpo anti-R-híbrido o fragmento de unión a antígeno comprende por lo menos una región determinante complementaria de origen no humano y por lo menos una región marco que tiene por lo menos un residuo humano, en donde dicho anticuerpo se caracteriza por:

a) unir R-híbrido pero no IR solo; y/o

b) inhibir la unión entre un R-híbrido humano y su ligando nativo, designado preferiblemente aquí IGF1 y/o IGF2 y/o insulina, con una constante de inhibición y/o IC_{50} de menos de 100nM, preferiblemente menos de 50 nM; y/o

c) inhibir específicamente la actividad tirosina cinasa de dicho R-híbrido; y/o

d) poseer una afinidad de unión de 10nM, o menos, para dicho R-híbrido; y/o

e) regular por disminución la expresión del R-híbrido; y/o

f) inhibir *in vivo* el crecimiento tumoral; en donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que incluye secuencias de aminoácidos FR1, FR2 y FR3 humano que corresponden a las de la linaje germinal tales como, por ejemplo, la linaje germinal humana del subgrupo I (A) Kabat, o sustituciones conservadoras o mutaciones somáticas en ella,

en donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que incluye secuencias de aminoácidos FR1, FR2 y FR3 humano que corresponden a las de la linaje germinal humana tal como, por ejemplo, la linaje germinal humana del subgrupo II Kabat, o sustituciones conservadoras o mutaciones somáticas en ella, y

en donde las secuencias FR se enlazan con secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 derivadas de una fuente no humana y comprenden las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo conformado por SEQ ID No. 8, 10 y 12, y/o

en donde las secuencias FR de la cadena ligera se enlazan con CDR1, CDR2 y CDR3 de secuencias derivadas de una fuente no humana y comprenden las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo conformado por SEQ ID No. 2, 4 y 6.

Por otra parte, de acuerdo con una tercera incorporación de la invención, se contempla un anticuerpo anti-IGF-IR humanizado y R-híbrido o su fragmento de unión a antígeno, en donde dicho anticuerpo anti-IGF-IR y R-híbrido o fragmento de unión a antígeno comprende por lo menos una región determinante complementaria de origen no humano y por lo menos una región marco que tiene por lo menos un residuo humano, en donde dicho anticuerpo se caracteriza por:

a) unir IGF-IR y R-híbrido pero no IR solo; y/o

b) inhibir la unión entre un IGF-IR humano y su ligando nativo, designado preferiblemente aquí IGF1 y/o IGF2, con una constante de inhibición y/o IC_{50} de menos de 100 nM, preferiblemente menos de 50 nM, y asimismo un R-híbrido humano, y su ligando natural designado aquí IGF1 y/o IGF2 y/o insulina, con una constante de inhibición y/o IC_{50} de menos de 100 nM, preferiblemente menos de 50 nM; y/o

c) inhibir específicamente la actividad tirosina cinasa de los dos dichos IGF-IR y R-híbrido; y/o

d) poseer una afinidad de unión de 10 nM, o menos, para dicho R-híbrido y de 10 nM, o menos, para dicho IGF-IR; y/o

e) regular por disminución la expresión de los dos IGF-IR y R-híbrido; y/o

f) inhibir *in vivo* el crecimiento tumoral;

en donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que incluye secuencias FR1, FR2 y FR3 humano que

corresponden a las de una linaje germinal humana tal como, por ejemplo, la linaje germinal humana del subgrupo I(A) Kabat, o sustituciones conservadoras o mutaciones somáticas en ella, y/o

en donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que incluye secuencias de aminoácidos FR1, FR2 y FR3 humanos, que corresponden a las de una linaje germinal humana tal como, por ejemplo, la linaje germinal human del subgrupo II Kabat, o sustituciones conservadoras o mutaciones somáticas en ella, y

en donde las secuencias FR se enlazan con secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 derivadas de una fuente no humana y comprenden las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo conformado por SEQ ID No. 8, 10 y 12, y/o

en donde las secuencias FR de la cadena ligera se enlazan con CDR1, CDR2 y CDR3 de secuencias derivadas de una fuente no humana y comprenden las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo conformado por SEQ ID No. 2, 4 y 6.

Del mismo modo, la invención describe un método de modular la actividad IGF-IR en células mamíferas sensibles a IGF-IR, que comprende: poner en contacto las células con un anticuerpo específico de dicho receptor, en donde dicho anticuerpo comprende una cadena ligera y pesada, comprendiendo dicha cadena ligera por lo menos una región determinante complementaria CDR seleccionada de las CDRs de secuencia SEQ ID No. 2, 4 y 6 y comprendiendo dicha cadena pesada por lo menos una región determinante complementaria CDR seleccionada de las CDRs de secuencia SEQ ID No. 8, 10 y 12.

En una segunda incorporación, la invención describe un método de modular la actividad de R-híbrido en células mamíferas sensibles a R-híbrido, que comprende: poner en contacto las células con un anticuerpo específico de dicho receptor, en donde dicho anticuerpo comprende una cadena ligera y pesada, comprendiendo dicha cadena ligera por lo menos una región determinante complementaria CDR seleccionada de las CDRs de secuencia SEQ ID No. 2, 4 y 6, y comprendiendo dicha cadena pesada por

lo menos una región determinante complementaria CDR seleccionada de las CDRs de secuencia SEQ ID No. 8, 10 y 12.

Seguidamente, en una tercera incorporación, un objeto de la presente invención es un método de modular conjuntamente las actividades IGF-IR y R-híbrido en células mamíferas sensibles a IGF-IR y R-híbrido, que comprende: poner en contacto las células con un anticuerpo específico de dicho receptor, en donde dicho anticuerpo comprende una cadena ligera y pesada, comprendiendo dicha cadena ligera por lo menos una región determinante complementaria CDR seleccionada de las CDRs de secuencia SEQ ID No. 2, 4 y 6, y comprendiendo dicha cadena pesada por lo menos una región determinante complementaria CDR, seleccionada de las CDRs de secuencia SEQ ID No,. 8, 10 y 12.

Más particularmente, los métodos ya descritos, y en donde el anticuerpo modula la actividad IGF-IR, se dirige contra, sin limitación, células mamíferas seleccionadas del grupo conformado por células de cáncer de mama, células de cáncer de próstata, células de cáncer colorrectal, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de vejiga, células de cáncer de riñón, células de cáncer de tiroides, células de osteosarcomas, células de cáncer pancreático, melanoma y células mieloides.

El método ya descrito, en donde el anticuerpo modula la actividad de R-híbrido, se dirige contra, sin limitación, células mamíferas seleccionadas del grupo conformado por células de cáncer de mama o células de cáncer de tiroides. Lo mismo para la modulación de ambos, R-híbrido e IGF-IR.

La invención se ocupa igualmente de un método de disminuir la actividad IGF-IR en células mamíferas sensibles a IGF-IR, que comprende: poner en contacto las células con un anticuerpo específico de dicho receptor en una cantidad suficiente para disminuir la actividad de IGF-IR, en donde dicho anticuerpo comprende una cadena ligera y pesada, comprendiendo dicha cadena ligera por lo menos una región determinante complementaria CDR, seleccionada de las CDRs de secuencia SEQ ID No. 2, 4 y 6, y comprendiendo dicha cadena pesada por lo menos una región determinante

318
318

complementaria CDR, seleccionada de las CDRs de secuencia SEQ ID No. 8, 10 y 12.

En una manera similar al método anterior, la invención concierne, en una segunda incorporación, un método de disminuir la actividad del R-híbrido en células mamíferas sensibles a R-híbrido, que comprende: poner en contacto las células con un anticuerpo específico de dicho receptor en una cantidad suficiente para disminuir la actividad de R-híbrido, en donde dicho anticuerpo comprende una cadena ligera y pesada, comprendiendo dicha cadena ligera por lo menos una región determinante complementaria CDR, seleccionada de las CDRs de secuencia SEQ ID No. 2, 4 y 6, y comprendiendo dicha cadena pesada por lo menos una región determinante complementaria CDR, seleccionada de las CDRs de secuencia SEQ ID No. 8, 10 y 12.

En una tercera incorporación, se contempla un método de disminuir conjuntamente las actividades de IGF-IR y R-híbrido en células mamíferas sensibles a IGF-IR y R-híbrido, que comprende: poner en contacto las células con un anticuerpo específico de dichos receptores en una cantidad suficiente para disminuir las actividades de IGF-IR y R-híbrido, en donde dicho anticuerpo comprende una cadena ligera y pesada, comprendiendo dicha cadena ligera por lo menos una región determinante complementaria CDR, seleccionada de las CDRs de secuencia SEQ ID No. 2, 4 y 6, y comprendiendo dicha cadena pesada por lo menos una región determinante complementaria CDR, seleccionada de las CDRs de secuencia SEQ ID No. 8, 10 y 12.

El método ya mencionado, en donde el anticuerpo disminuye la actividad IGF-IR, concierne a células mamíferas seleccionadas del grupo conformado por, sin limitación, células de cáncer de mama, células de cáncer de próstata, células de cáncer colorrectal, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de vejiga, células de cáncer de riñón, células de cáncer de tiroides, células de osteosarcomas, células de cáncer pancreático, melanoma y células mieloides.

El método ya mencionado, en donde el anticuerpo disminuye la actividad del R-híbrido, concierne a células mamíferas seleccionadas del grupo conformado por, sin limitación, células de cáncer de mama o células de cáncer de tiroides. Lo mismo para los dos R-híbrido e IGF-IR.

La invención tiene que ver también con un método de identificar un modulador de IGF-IR, que comprende:

a) poner en contacto IGF-IR con un anticuerpo de acuerdo con la invención capaz de unir IGF-IR;

b) poner en contacto el complejo de (a) con una biblioteca de compuestos;

c) identificar un compuesto que desestabiliza el complejo de (a); y

d) determinar si el compuesto exhibe actividad agonista o antagonista en el IGF-IR, en donde esta actividad indica identificación de un modulador de IGF-IR.

En una segunda incorporación, la invención consiste en un método de identificar un modulador de R-híbrido, que comprende:

a) poner en contacto el R-híbrido con un anticuerpo de acuerdo con la invención capaz de unir el R-híbrido;

b) poner en contacto el complejo de (a) con una biblioteca de compuestos;

c) identificar un compuesto que desestabiliza el complejo de (a); y

d) determinar si el compuesto exhibe actividad agonista o antagonista en el R-híbrido, en donde esta actividad indica identificación de un modulador de R-híbrido.

En una tercera incorporación, es un objeto de la invención un método de identificar un modulador de IGF-IR y R-híbrido, que comprende los siguientes pasos:

a) poner en contacto el IGF-IR y el R-híbrido con un anticuerpo de acuerdo con la invención capaz de unir el IGF-IR y el R-híbrido;

b) poner en contacto el complejo de (a) con una biblioteca de compuestos;

c) identificar un compuesto que desestabiliza el complejo de (a); y

d) determinar si el compuesto exhibe actividad agonista o antagonista en el IGF-IR y el R-híbrido, en donde esta actividad indica identificación de un modulador de IGF-IR y R-híbrido.

La presente invención describe además un método de identificar un modulador de IGF-IR, que comprende:

a) cribar una biblioteca de secuencias de péptidos, en donde dicha biblioteca de secuencias de péptidos se une a IGF-IR, y en donde la biblioteca se deriva de una secuencia de péptidos, que comprende por lo menos una secuencia seleccionada del grupo conformado por SEQ ID No. 2, 4, 6, 8, 10 y 12; y

b) determinar si la secuencia de aminoácidos aislada en (a) exhibe actividad agonista o antagonista en células sensibles a IGF-IR seleccionadas del grupo conformado por estirpes celulares que presentan IGF-IR, tales como, por ejemplo, MCF-7, T47D, BT20, ZR-75-1, MDA-MB-231 para células de mama, PC3 y DU145 para células de próstata, A549, A427 y SK-LU-1 para células de pulmón, HT29, Colo205 y CaCo-2 para células de colon, BC-PAP, FRO y ARO para células de tiroides, SK-OV-3 para células de ovarios, BxPC3, MiaPaCa-2 y LN36 para células de páncreas, SK-ES-1 para células de sarcoma renal y suprarrenal, Daoy, TE-671 y D283 Med para células de meduloblastoma, MM-1S y MM-1R para células de mieloma múltiple de retinoblastoma y SK-MEL-28 para células de melanoma, en donde esta actividad indica identificación de un modulador de IGF-IR.

Se describe igualmente un método de identificar un modulador de R-híbrido, que comprende:

a) cribar una biblioteca de secuencias de péptidos, en donde dicha biblioteca de secuencias de péptidos se une a R-híbrido, y en donde la biblioteca se deriva de una secuencia de péptidos que comprende por lo menos una secuencia, preferiblemente 2, 3, 4, 5 y 6 secuencias diferentes, seleccionadas del grupo conformado por SEQ ID No. 2, 4, 6, 8, 10 y 12; y

b) determinar si la secuencia de aminoácidos aislada en (a) exhibe actividad agonista o antagonista en células sensibles a R-híbrido, seleccionadas del grupo conformado por estirpes celulares que presentan R-híbrido, tales como, por ejemplo, MDA-MB-231, MDA-MB-157, MDA-MB-468, MDA-MB-453 y ZR-75 para células de mama y BC-PAP para células de tiroides, en donde esta actividad indica identificación de un modulador de R-híbrido.

Seguidamente, en una tercera incorporación, es también un objeto de la invención desarrollar un método de identificar un modulador de IGF-IR y R-híbrido, que comprende:

a) cribar una biblioteca de secuencias de péptidos, en donde dicha biblioteca de secuencias de péptidos se une a IGF-IR y/o R-híbrido, y en donde la biblioteca se deriva de una secuencia de péptidos, que comprende por lo menos una secuencia, preferiblemente 2, 3, 4, 5 y 6 diferentes secuencias, seleccionadas del grupo conformado por SEQ ID No. 2, 4, 6, 8, 10 y 12; y

b) determinar si la secuencia de aminoácidos aislada en (a) exhibe actividad agonista o antagonista en células sensibles a IGF-IR y/o R-híbrido, seleccionadas del grupo conformado por estirpes celulares que presentan IGF-IR y/o R-híbrido, tales como, por ejemplo, MCF-7, T47D, BT20, ZR-75-1, MDA-MB-231, MDA-MB-157, MDA-MB-468, MDA-MB- 453 y ZR-75 para células de mama, PC3 y DU145 para células de próstata, A549, A427 y SK- LU-1 para células de pulmón, HT29, Colo205 y CaCo-2 para células de colon, BC-PAP, FRO y ARO para células de tiroides, SK-OV-3 para células de ovarios, BxPC3, MiaPaCa-2 y LN36 para células de páncreas, SK-ES-1 para células de cáncer renal y suprarrenal, sarcoma, Daoy, TE-671 y D283 Med para células de meduloblastoma, MM-1S y MM-1R para células de mieloma múltiple, retinoblastoma y SK-MEL-28 para células de melanoma, en donde esta actividad indica identificación de un modulador de IGF-IR y R-híbrido.

322
322

Un objeto de la invención es un método de tratar o prevenir una condición médica en un sujeto, condición médica que está medida por expresión elevada y/o activación de IGF1, que comprende administrar una composición de fijación que se une específicamente a IGF-IR, que incluye por lo menos un miembro seleccionado del grupo conformado por:

a) una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende CDR-L1 definido por SEQ ID No. 2, CDR-L2 definido por SEQ ID No. 4 y CDR-L3 definido por SEQ ID No. 6; y/o

b) una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende CDR-H1 definido por SEQ ID No. 8, CDR-H2 definido por SEQ ID No. 10 y CDR-H3 definido por SEQ ID No. 12; al sujeto.

En una segunda incorporación, un objeto de la invención es un método de tratar o prevenir una condición médica en un sujeto, condición médica que está medida por expresión elevada y/o activación de R-híbrido que comprende administrar una composición de fijación que se une específicamente al R-híbrido, que incluye por lo menos un miembro seleccionado del grupo conformado por:

a) una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende CDR-L1 definido por SEQ ID No. 2, CDR-L2 definido por SEQ ID No. 4 y CDR-L3 definido por SEQ ID No. 6; y/o

b) una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende CDR-H1 definido por SEQ ID No. 8, CDR-H2 definido por SEQ ID No. 10 y CDR-H3 definido por SEQ ID No. 12; al sujeto.

En una tercera incorporación, un objeto de la invención es un método de tratar o prevenir una condición médica en un sujeto, condición médica que está medida por expresión elevada y/o activación de IGF-IR y R-híbrido, que comprende administrar una composición de fijación que se une específicamente a IGF-IR y R-híbrido, que incluye por lo menos un miembro seleccionado del grupo conformado por:

a) una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende CDR-L1 definido por SEQ ID No. 2, CDR-L2 definido por SEQ ID No. 4 y CDR-L3 definido por SEQ ID No. 6; y/o

b) una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende CDR-H1 definido por SEQ ID No. 8, CDR-H2 definido por SEQ ID No. 10 y CDR-H3 definido por SEQ ID No. 12; al sujeto.

Otro objeto de la invención es un método de determinar la regresión, evolución o iniciación de un trastorno patológico caracterizado por expresión incrementada y/o activación de IGF-IR humano, relativa a la normal, que comprende incubar una muestra obtenida de un paciente aquejado de dicho trastorno, con una sonda detectable que es específica para dicho IGF-IR humano bajo condiciones que favorecen la formación de un complejo sonda/IGF-IR, cuya presencia es indicativa de la regresión, evolución o iniciación de dicho trastorno patológico en dicho paciente.

En una segunda incorporación, otro objeto de la invención es un método de determinar la regresión, evolución o iniciación de un trastorno patológico caracterizado por expresión incrementada y/o activación de R-híbrido humano, relativa a la normal, que comprende incubar una muestra obtenida de un paciente aquejado de dicho trastorno, con una sonda detectable que es específica para dicho R-híbrido humano, bajo condiciones que favorecen la formación de un complejo sonda/R-híbrido, cuya presencia es indicativa de la regresión, evolución o iniciación de dicho trastorno patológico en dicho paciente.

En una tercera incorporación, otro aspecto de la invención es un método de determinar la regresión, evolución o iniciación de un trastorno patológico caracterizado por expresión incrementada y/o activación de ambos, el IGF-IR y el R-híbrido humanos, relativa a la normal, que comprende incubar una muestra obtenida de un paciente, aquejado de dicho trastorno, con una sonda detectable que es específica para dicho IGF-IR y R-híbrido humanos, bajo condiciones que favorecen la formación de un complejo sonda/R-híbrido y un complejo sonda/IGF-IR, cuya presencia es

indicativa de la regresión, evolución o iniciación de dicho trastorno patológico en dicho paciente.

Por las referencias a "normal", se quiere dar a entender la expresión normal o activación normal de IGF-IR, R-híbrido o ambos. Cualesquiera métodos de determinar los niveles de expresión, o activación, conocidos por el experto en el arte pueden utilizarse y se incorporan en la presente especificación. Un ejemplo de tal método se describe en el Ejemplo 42 más adelante.

En el método ya descrito, la sonda es preferiblemente un anticuerpo, marcándose dicho anticuerpo preferiblemente con un marcador radioactivo, un marcador fluorescente o una enzima, y comprendiendo dicho anticuerpo preferiblemente el anticuerpo de la invención, como se describe en la presente especificación.

Aún otro aspecto de la invención es un método de seguir la evolución de un régimen terapéutico diseñado para aliviar una enfermedad caracterizada por la expresión y/o activación anormal de IGF-IR humano, relativa a la normal, que comprende:

a) analizar una muestra de un sujeto para determinar el nivel de expresión y/o activación de dicho IGF-IR en un primer punto de tiempo;

b) administrar el anticuerpo de la invención, capaz de unir IGF-IR, a dicho sujeto y analizar el nivel de expresión y/o activación de dicho IGF-IR en puntos de tiempo subsiguientes luego de la administración de dicho anticuerpo; y c) comparar dicho nivel de dicho IGF-IR en dichos puntos de tiempo subsiguientes con el nivel determinado en (a) como determinación del efecto de dicho régimen terapéutico, en donde una disminución en dicho nivel de expresión y/o activación de IGF-IR, luego de la administración de dicho anticuerpo anti-IGF-IR, indica una evolución positiva del régimen terapéutico diseñado para aliviar dicha enfermedad.

En una segunda incorporación, es también un aspecto de la invención proteger un método de seguir la evolución de un régimen terapéutico diseñado para aliviar una enfermedad caracterizada por la expresión y/o

activación anormal de R-híbrido humano, relativa a la normal, que comprende:

a) analizar una muestra de un sujeto para determinar el nivel de expresión y/o activación de dicho R-híbrido en un primer punto de tiempo;

b) administrar el anticuerpo de la invención, capaz de unir R-híbrido, a dicho sujeto y analizar el nivel de expresión y/o activación de dicho R-híbrido en puntos de tiempo subsiguientes, luego de la administración de dicho anticuerpo; y

c) comparar dicho nivel de dicho R-híbrido, en dichos puntos de tiempo subsiguientes, con el nivel determinado en (a) como determinación del efecto de dicho régimen terapéutico, en donde una disminución en dicho nivel de expresión y/o activación de R-híbrido, subsiguiente a la administración de dicho anticuerpo anti-R-híbrido indica una evolución positiva del régimen terapéutico diseñado para aliviar dicha enfermedad.

En un tercer aspecto, la invención reivindica un método de seguir la evolución de un régimen terapéutico diseñado para aliviar una enfermedad caracterizada por expresión y/o activación anormal de ambos, el IGF-IR y el R-híbrido humanos, relativa a la normal, que comprende:

a) analizar una muestra de un sujeto para determinar el nivel de expresión y/o activación de dichos IGF-IR y R-híbrido en un primer punto de tiempo;

b) administrar el anticuerpo de la invención, capaz de unir los dos IGF-IR y el R-híbrido, a dicho sujeto y analizar el nivel de expresión y/o activación de dichos IGF-IR y R-híbrido en puntos de tiempo subsiguientes luego de la administración de dicho anticuerpo; y

c) comparar dicho nivel de dichos IGF-IR y R-híbrido, en dichos puntos de tiempo subsiguientes, con el nivel determinado en (a) como determinación del efecto de dicho régimen terapéutico, en donde una disminución en dicho nivel de expresión y/o activación de IGF-IR y R-híbrido, subsiguiente a la administración de dicho anticuerpo anti-IGF-IR y R-híbrido indica una evolución positiva del régimen terapéutico diseñado para aliviar dicha enfermedad.

La enfermedad ya mencionada comprende i) un tumor que expresa por lo menos un IGF-IR, preferiblemente cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de tiroides, osteosarcomas, cáncer pancreático, melanoma y cáncer mieloide; o ii) un tumor que expresa por lo menos un R-híbrido, preferiblemente cáncer de mama o cáncer de tiroides.

Los métodos ya descritos pueden incluir igualmente, antes de la administración del paso b), el paso que consiste en medir la concentración de un antígeno tumoral específico en una muestra del cuerpo del mamífero, en donde una concentración elevada de dicho antígeno tumoral específico por encima de un rango de referencia para dicho antígeno tumoral específico indica un mayor riesgo de cáncer.

Antígenos tumorales específicos se describen en el Ejemplo 43 más adelante. También pueden utilizarse marcadores genéticos (ver Ejemplo 43).

Métodos ya descritos, preferiblemente métodos de tratar/prevenir una enfermedad o métodos de seguir la evolución de un régimen terapéutico, comprenden administrar a dicho mamífero el anticuerpo de la invención en combinación con un agente seleccionado del grupo conformado por un agente corticosteroide, anti-emético, vacuna contra el cáncer, analgésico, anti-vascular, citocinas, inmunoestimulante no específico y anti-proliferativo.

En una incorporación preferida, dicho agente anti-emético se selecciona del grupo conformado por, sin limitación, ondansetron clorhidrato, granisetron clorhidrato, metroclopramida, domperidona, haloperidol, ciclizina, lorazepam, proclorperazina, dexametasona, levomepromazina, o tropisetron.

En otra incorporación preferida, dicho agente analgésico se selecciona del grupo conformado por, sin limitación, ibuprofeno, naproxeno, trisalicilato de magnesio y colina, o clorhidrato de oxicodona.

En otra incorporación particularmente preferida, dicho agente anti-proliferativo se selecciona del grupo conformado por, sin limitación, inhibidores de farnesil proteína transferasa, inhibidores .alpha.v.beta.3, inhibidores .alpha.v.beta.5, inhibidores p53, inhibidores VEGF, inhibidores VEGFR, inhibidores EGFR e inhibidores Her2neu o sus heterodímeros, e inhibidores PDGFR.

Métodos ya descritos, preferiblemente métodos de tratar/prevenir una enfermedad o métodos de seguir la evolución de un régimen terapéutico se caracterizan porque dicho anticuerpo comprende una cadena pesada que incluye las secuencias de aminoácidos de CDR-1, CDR-2 y CDR-3, en donde dichas CDRs de cadena pesada se seleccionan del grupo conformado por SEQ ID No. 8, 10 ó 12, y una cadena ligera que incluye las secuencias de aminoácidos de CDR-1, CDR-2 y CDR-3, en donde dichas CDRs de cadena ligera se seleccionan del grupo conformado por SEQ ID No. 2, 4 ó 6, o secuencias que tienen variaciones de dichas secuencias CDR, seleccionadas del grupo conformado por variaciones conservadoras, en donde dichas variaciones conservadoras se seleccionan del grupo conformado por reemplazo de residuos no polares por otros residuos no polares, reemplazo de residuos de carga polar por otros residuos sin carga polar, reemplazo de residuos de carga polar por otros residuos de carga polar, y sustitución de residuos estructuralmente similares; y sustituciones no conservadoras, en donde dichas sustituciones no conservadoras se seleccionan del grupo conformado por sustitución de residuo de carga polar por residuos sin carga polar y sustitución de residuos no polares por residuos polares, adiciones y eliminaciones.

En otro aspecto de la invención, se reivindica una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un trastorno en un mamífero, que contiene una cantidad de anticuerpo anti-IGF-IR humano, que es efectiva en tratar dicho trastorno, y un portador farmacéuticamente aceptable, en donde dicho trastorno se selecciona del grupo conformado por células de cáncer de mama, células de cáncer de próstata, células de cáncer colorrectal, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de vejiga,

células de cáncer de riñón, células de cáncer de tiroides, células de osteosarcomas, células de cáncer pancreático, melanoma y células mieloides, en donde dicho anticuerpo contiene el anticuerpo de la invención ya descrito y capaz de unir IGF-IR.

Otra incorporación es una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un trastorno en un mamífero, que contiene una cantidad de un anticuerpo anti-R-híbrido humano, el cual es efectivo en tratar dicho un trastorno, y un portador farmacéuticamente aceptable, en donde dicho trastorno se selecciona del grupo conformado por cáncer de mama y cáncer de tiroides, en donde dicho anticuerpo contiene el anticuerpo de la invención capaz de unir el R-híbrido.

Otra incorporación es asimismo una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención de un trastorno en un mamífero, que contiene una cantidad de un anticuerpo anti-IGF-IR y R-híbrido humano, el cual es efectivo en tratar dicho trastorno, y un transportador farmacéuticamente aceptable, en donde dicho trastorno se selecciona del grupo conformado por cáncer de mama y cáncer de tiroides, en donde dicho anticuerpo contiene el anticuerpo de la invención capaz de unir IGF-IR y R-híbrido.

Dicha composición (composiciones) farmacéutica contiene además una cantidad de un agente anti-emético, vacuna contra el cáncer, analgésico, anti-vascular, y anti-proliferativo que, en combinación con dicho anticuerpo, es efectivo en tratar dicho trastorno.

La invención concierne, en otro aspecto, a un método de detectar una pareja de unión para el anticuerpo de la invención capaz de unir IGF-IR en una muestra, método que comprende:

a) incubar el anticuerpo de la invención, capaz de unir IGF-IR, con una muestra biológica obtenida de una paciente con un trastorno proliferativo celular, caracterizado por un nivel anormal de expresión y/o activación de IGF-IR humano, bajo condiciones suficientes para permitir la unión específica del anticuerpo a su pareja de unión, y

b) detectar unión específica, en donde unión específica indica la presencia de una pareja de unión en la muestra.

Una segunda incorporación es un método de detectar una pareja de unión para el anticuerpo de la invención, capaz de unir R-híbrido en una muestra, método que comprende:

a) incubar el anticuerpo de la invención, capaz de unir R-híbrido, con una muestra biológica obtenida de un paciente con un trastorno proliferativo celular, caracterizado por un nivel anormal de expresión y/o activación de R-híbrido humano, bajo condiciones suficientes para permitir la unión específica del anticuerpo a su pareja de unión, y

b) detectar unión específica, en donde unión específica indica la presencia de una pareja de unión en la muestra.

Una tercera incorporación de la invención es un método de detectar contrapartes de unión para el anticuerpo de la invención capaz de unir IGF-IR y R-híbrido en una muestra, método que comprende:

a) incubar el anticuerpo de la invención, capaz de unir IGF-IR y R-híbrido, con a muestra biológica obtenida de un paciente con un trastorno proliferativo celular, caracterizado por un nivel anormal de expresión y/o activación de los dos IGF-IR y R-híbrido humanos, bajo condiciones suficientes para permitir unión específica del anticuerpo a su pareja de unión, y

b) detectar unión específica, en donde unión específica indica la presencia de una pareja de unión en la muestra.

La invención se ocupa también de un método purificar un receptor híbrido de una muestra, método que comprende:

a) incubar el anticuerpo de la invención, capaz de unir R-híbrido, con una muestra bajo condiciones que permitan unión específica del anticuerpo y el receptor, y

b) separar el anticuerpo de la muestra y obtener el receptor purificado.

Una segunda incorporación es un método de purificar un IGF-IR de una muestra, método que comprende:

a) incubar el anticuerpo de la invención, capaz de unir IGF-IR, con una muestra bajo condiciones que permitan unión específica del anticuerpo y el receptor, y

b) separar el anticuerpo de la muestra y obtener el receptor purificado.

Por lo menos, es también un objeto de la invención proteger el uso de los datos biológicos obtenidos de acuerdo con uno de los métodos de la invención para la determinación y/o modificación de un tratamiento terapéutico o régimen.

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

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática de IGF-IR.

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

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

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

Figuras 4A, 4B y 4C: Marcación de células de insecto Sf9 que expresan respectivamente IGF-IR o IR.

Figura 4A muestra la marcación de células no transfectadas solas (1) o células marcadas con anticuerpos monoclonales comerciales de control, que

reconocen respectivamente IGF-IR (2) o IR(3). En Figura 4B, células Sf9 que expresan únicamente IGF-IR se marcan con αIR3 (2) o anti-IR (3), representando el pico (1) las células solas. En Figura 4C, células Sf9 que expresan únicamente IR se marcan con un anti-IR (3) o αIR3 (2), representando el pico (1) las células solas.

Figura 5: Efecto inhibidor del anticuerpo 7C10 en la proliferación de células MCF-7 inducida por IGF-I.

Las células MCF-7 se incuban en la presencia de concentraciones crecientes de IGF1 en la presencia o en la ausencia del MAB a probarse. La proliferación celular se evalúa luego de la incorporación de ^{3}H timidina. El anticuerpo comercial αIR3 se emplea como un control a positivo del experimento. El7G3 es una IgG1 anti-IGF-IR murina sin actividad sobre la proliferación, y se usa como isotipo control.

Figuras 6A, 6B y 6C:

- Figura 6A: Efecto *in vivo* del anticuerpo monoclonal 7C10 en el crecimiento de tumores MCF-7 establecidos en ratones desprotegidos inmunitariamente;

- Figuras 6B y 6C: Figuras respectivamente de publicaciones de Arteaga et al. (J. Clin. Invest., 84, 1418-1423, 1989) y de Li et al. (Cancer Immunol. Immunother., 49, 243-252), y que muestra para Figura 6B el efecto de αIR3 murino (también escrito aIR3) y para Figura 6C el efecto de un scFv-Fc recombinante, derivado del anticuerpo 1H7 sobre el crecimiento tumoral.

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

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

Figura 8A muestra los resultados obtenidos de un modelo de osteosarcoma SK-ES-1; Figura 8B concierne a un tumor independiente de andrógeno de la próstata DU-145; Figura 8C es un modelo de un tumor amicrocítico del pulmón A549 y Figura 8D es un modelo de cáncer

pancreático BxPC3. En estos 4 modelos, el tratamiento se llevó a cabo dos veces por semana i.p. a una tasa de 250 μg/dosis/ratón. Las curvas 7G3, EC2 y 9G4 corresponden respectivamente a tres IgG1 murinas usadas como isotipo control de experimento en cada uno de los modelos.

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

Figura 10: Actividad comparativa de MAb αIR3, 7C10 y 1H7 sobre la proliferación IGF2 inducida por células MCF-7.

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

Figura 12: Efecto comparativo del 7C10 y h7C10 MAb (humanizado 1, escrito aquí 7H2HM) sobre el modelo *in vitro* de proliferación inducida por IGF1 de células MCF-7.

Figura 13: Efecto del 7C10 y h7C10 MAb (humanizado 1, escrito aquí 7H2HM) sobre la transducción de la señal inducida por IGF1. La primera línea de puntos corresponde a la revelación, por un anticuerpo antifosfotirosina, de la fosforilación de la cadena β inmunoprecipitada de las células incubadas en la presencia de IGF1 solo, o de IGF1 mezclada con varios anticuerpos a probarse. El 9G4 y el hIgG1 son respectivamente los isotipos de control de las formas 7C10 y h7C10 (escritas igualmente 7H2HM). La segunda línea de puntos corresponde a la revelación de la cadena y muestra que la cantidad depositada en la totalidad de los pocillos es perfectamente equivalente.

Figura 14: Secuencia del cADN (SEQ ID No. 48), de su hebra complementaria (SEQ ID No. 50) y de su traducción en aminoácidos (SEQ ID No. 49), del fragmento amplificado por PCR del hibridoma de ratón 7C10 con los cebadores MKV-1 y MKC y que codifica para el extremo 3' del péptido líder y 7C10 VL.

Figura 15: Secuencia del cADN (SEQ ID No. 51), de su hebra complementaria (SEQ ID No. 53) y de su traducción en aminoácidos (SEQ ID No. 52), del fragmento amplificado por PCR del hibridoma de ratón 7C10 con los cebadores MHV-12 y MHC-1, o MHV-8 y MHC-1 y que codifica para el extremo 3' del péptido líder y 7C10 VH.

Figura 16: Reconocimiento del receptor IGF-I por el anticuerpo quimérico 7C10, designado igualmente C7C10 (sobrenadante de cultivo celular cos7-transfectado).

Figura 17: Comparación de la secuencia de aminoácidos de 7C10 VL de ratón (SEQ ID No. 54) con células de otros anticuerpos de ratón que poseen la mayor homología de secuencia.

La numeración de los aminoácidos es la de Kabat et al. (1991). Los residuos en las regiones marco (CDRs exteriores) que difieren entre 7C10 VL y el subgrupo II de ratón de Kabat (SEQ ID No. 57) están subrayados. Un punto indica que el residuo es idéntico en esta posición en comparación con la secuencia de 7C10 VL. DRB1-4.3 (SEQ ID No. 55) representa la secuencia de la cadena ligera de un anticuerpo de ratón anti-humano MHC CLASE II Cadena B (el número de acceso en la base de datos de Kabat es N011794). C94-5B11'CL (SEQ ID No. 56) representa la secuencia de la cadena ligera de un anticuerpo de ratón (el número de acceso en la base de datos de Kabat es P019314).

Figura 18: Comparación de las secuencias de aminoácidos de 7C10 VL de ratón (SEQ ID No. 54) con células de cadenas ligeras humanas pertenecientes al subgrupo II humano de Kabat (SEQ ID No. 60) y que tienen la mayor homología de secuencia.

Las secuencias de aminoácidos se alinean y comparan con la de 7C10 VL de ratón. Un punto indica que el residuo es idéntico en esta posición en comparación con la secuencia de 7C10 VL. GM607 (SEQ ID No. 58) representa la secuencia de la cadena ligera kappa segregada por la estirpe linfoblastoide humana GM607 (Klobeck et al., Nucleic Acids Res., 12:6995-7006, 1984a and Klobeck et al., Nature, 309:73-76, 1984b, el número de acceso en la base de datos de Kabat es N011606). DPK15/A19

(SEQ ID No. 59) representa la secuencia de la estirpe germinal V humana V kappa II.

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

Las secuencias de aminoácidos se alinean y comparan con la de 7C10 VL de ratón. Un punto indica que el residuo es idéntico en esta posición en comparación con la secuencia de 7C10 VL. GM607 representa la secuencia la cadena ligera kappa segregada por la estirpe linfoblastoide humana GM607 (Klobeck et al., 1984a and 1984b, el número de acceso en la base de datos de Kabat es: N011606).

Figura 20: Secuencia de cADN (SEQ ID No. 62), su hebra complementaria (SEQ ID No. 64) y su traducción en aminoácidos (SEQ ID No. 63), del gen construido por ensamble *de novo* que codifica para el péptido líder y la versión humanizada 1 de 7C10 VL.

Figura 21: Secuencia de cADN (SEQ ID No. 66), su hebra complementaria (SEQ ID No. 68) y su traducción en aminoácidos (SEQ ID No. 67), del gen construido por ensamble *de novo* que codifica para el péptido líder y la versión humanizada 2 de 7C10 VL.

Figura 22: Comparación de las secuencias de aminoácidos de 7C10 VH de ratón (SEQ ID No. 69) con aquellas de cadenas pesadas de humano-ratón pertenecientes al subgrupo I (A) de ratón de Kabat y que tienen la mayor homología de secuencia.

La numeración de los aminoácidos es la de Kabat et al. (1991). Los residuos en las regiones marco (CDRs exteriores) que difieren entre 7C10 VL y el subgrupo I (A) de ratón de Kabat (SEQ ID No. 71) están subrayadas. Un punto indica que el residuo es idéntico en esta posición en comparación con la secuencia de 7C10 VH de ratón.

AN03'CL (SEQ ID No. 70) representa la secuencia de la cadena pesada de un anticuerpo de ratón (el número de acceso en la base de datos de Kabat es: P001289).

335

Figura 23: Comparación de secuencias de aminoácidos de 7C10 VH de ratón (SEQ ID No. 69) con las de cadenas pesadas humanas pertenecientes al subgrupo II humano de Kabat (SEQ ID No. 72) y que tienen la mayor homología de secuencia.

Los residuos subrayados son parte de las estructuras canónicas definidas por Chothia et al. (1989). Un punto indica que el residuo es idéntico en esta posición en comparación con la secuencia 7C10 VH de ratón. VH FUR1'CL humano (SEQ ID No. 73) representa la secuencia de la cadena pesada de una IgM/K de anticuerpo anti-laminina B humano de origen autoinmunitario (Mariette et al., Arthritis and Rheumatism, 36:1315-1324, 1993; número de acceso en Kabat: N020619). La estirpe germinal humana (SEQ ID No. 74) representa la secuencia de la estirpe germinal humana 4.22 VH IV (Sanz et al., EMBO. J. 8:3741-3748, 1989).

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

La numeración de los residuos corresponde a la de Kabat. Las secuencias se alinean y comparan con la 7C10 VH de ratón. Un punto indica que el residuo es idéntico en esta posición en comparación con la secuencia 7C10 VH de ratón.

Figura 25: Secuencia de cADN (SEQ ID No. 76), su hebra complementaria (SEQ ID No. 78) y su traducción en aminoácidos (SEQ ID No. 77), del gen construido por ensamble de novo que codifica para el péptido líder y la versión humanizada 1 de 7C10 VH.

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

Figura 27: Secuencia de cADN (SEQ ID No. 84), su hebra complementaria (SEQ ID No. 86) y su traducción en aminoácidos (SEQ ID No. 85), del gen

336
336

construido por ensamble *de novo* que codifica para el péptido líder y la versión humanizada 3 de 7C10 VH.

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

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

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

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

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

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

Figura 33A representa la proporción de las células MCF-7 en la fase G0/G1, S y G2/M en la ausencia de IGF1, expresada como porcentaje significativo de las células MCF-7 totales observadas.

Figura 33B representa la proporción de las células MCF-7 en la fase G0/G1, S y G2/M en la presencia de IGF1, expresada como porcentaje significativo de las células MCF-7 totales observadas.

Figura 33C representa la proporción de las células MCF-7 en la fase S (■) y G2/M (□), expresada como porcentaje significativo de las células MCF-7 totales observadas, en la presencia de los compuestos indicados en la Figura, comparada con una muestra de control en la ausencia de IGF1 ("0").

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

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

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

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

Figuras 37A - 37D: Demostración mediante marcación en FACS de la presencia de EGFR y IGF-IR en la superficie de células A549.

Figura38: Efecto de una administración conjunta del MAB 7C10 y 225 sobre el crecimiento *in vivo* del tumor A549.

Figura 39: Efecto de una administración conjunta del MAB 7C10 y 225 sobre la supervivencia de ratones ortotópicamente implantados con células A549.

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

Figura 41: Demostración de la inducción de la internalización de IGF-IR por el MAB 7C10 y 7H2HM.

Figuras 42A - 42C: Demostración de la degradación de IGF-IR por el MAB 7C10 y 7H2HM.

Figuras 43A y 43B: Inmunotransferencia con subunidades β anti-IGF-IR y subunidad β anti-IR en filtros que contenían lisados celulares obtenidos luego de la inmunoprecipitación y SDS-PAGE para dos experimentos independientes (A y B).

Figura 44: Inmunocaptura de lisados de células R+ IGF-IR en placas Maxisorb recubiertas con anticuerpo 17-69 y unión por ^{125}I-IGF1 en la ausencia o la presencia de concentraciones crecientes de ligando sin marcar (IGF-I) o anticuerpos (7C10, h7C10, 1H7, 9G4).

Figura 45: Inmunocaptura de lisados de células R-/IR-A R-híbrido^{A} en placas Maxisorb recubiertas con anticuerpo83-7 y unión por ^{125}I-IGF1 en la ausencia o la presencia de concentraciones crecientes de ligando sin marcar (IGF-I) o anticuerpos (7C10, h7C10, 1H7, 9G4).

Figura 46: Inmunocaptura de lisados de células R-/IR-B R-híbrido^{B} en placas Maxisorb recubiertas con anticuerpo 83-7 y unión por ^{125}I-IGF1 en la ausencia o la presencia de concentraciones crecientes de ligando sin marcar (IGF-I) o anticuerpos (7C10, h7C10, 1H7, 9G4).

Figuras 47A y 47B: Análisis de inmunotransferencia de degradación inducida por anticuerpo del IGF-IR en células A549 (A) y MCF-7 (B).

Figura 48: Análisis de inmunotransferencia (***"immuno-blotting"***) de la ruta de degradación de anticuerpo de IGF-IR en células MCF-7.

Figura 49: Actividad anti-tumoral del anticuerpo murino 7C10 administrado conjuntamente con un anticuerpo anti-VEGF en ratones ortotópicamente implantados con células A549.

Figuras 50 y 51: Comparación de la actividad antitumoral *in vivo* de los anticuerpos 7C10 y h7C10 sobre los modelos A549 (Figura 50) y MCF-7 (Figura 51).

Figuras 52 y 53: Comparación de la actividad anti-leucemia de vinblastina y vincristina (figura 52) y de 4'R y 4'S deoxivinblastinas (Figura 53).

Figura 54: Actividad antitumoral *in vivo* de 4'R y 4'S-deoxivinblastinas conjugadas con anticuerpos IGR-IR en tumores humanos de varios orígenes.

Figura 55: Representación esquemática del ensayo de captura con biosensor. Un Mab dirigido contra la porción Fc constante de IgG1 humana o de ratón se unió covalentemente en la superficie de un sensor CM5. Una cantidad limitada (400 RU) de Mab a probarse se inmovilizó y utilizó para capturar el analito hIGF-IR. La unión de Mab al analito se describe por las constantes de velocidad de asociación y disociación k_a y k_d, respectivamente.

Figuras 56A, 56B y 56C: Determinación de IC_{50} de h7C10 en el ensayo proliferativo inducido por IGF1. Los resultados se expresan como índices proliferativos en panel A. Panel B muestra un ejemplo del cálculo de IC_{50} y panel C resume los datos de IC_{50} obtenidos con 5 lotes diferentes de anticuerpo h7C10.

Figuras 57A, 57B, 57C y 57D: 7C10 causa una rápida regulación por disminución de IGF-IR mediante la ruta proteasoma (Fig. 57A). Rutas lisosómicas/endosómicas (Figs. 57B y 57C) parecen estar asimismo implicadas en la regulación por disminución inducida por el anticuerpo. Panel (Fig. 57D) muestra la baja recuperación del IGF-IR luego del tratamiento con anticuerpo. En estas Figuras 9G4 y 7G3 Mabs son respectivamente un anticuerpo IgG1 irrelevante y un anticuerpo anti-IGF-IR no neutralizante (isotipo IgG1).

Figura 58: Tinción de tejidos tumorales o normales de pacientes con cáncer de mama y pulmón. Comparación con tejidos de regiones normales.

Figura 59: Regulación por disminución de inducida por h7C10 de IGF-IR *in vivo*. Se estudiaron nueve ratones Swiss inmunitariamente desprotegidos, portadores de un tumor de xenoinjerto MCF-7. Los tumores de 3 ratones se extirparon antes del tratamiento (franjas 1-3), 3 ratones se trataron con h7C10 (franjas 4-6) y 3 ratones recibieron control de isotipo humano (IgG1). Franja 9 no es interpretable debido a la baja cantidad de proteína cargada (CK19).

Figuras 60A, 60B, 60C: Determinación de IC_{50} de h7C10 en el ensayo proliferativo inducido por IGF2. Los resultados se expresan como índices proliferativos en panel A. Panel B muestra un ejemplo de cálculo de IC_{50} y

panel C resume los datos de IC_{50} obtenidos con 5 diferentes lotes de anticuerpo h7C10.

Ejemplo 1: Generación y selección del anticuerpo monoclonal murino (MAb)

Con el fin de generar MAb dirigido específicamente contra IGF-IR y que no reconozca el IR, se contempló un protocolo que contiene 6 etapas de cribado.

Éste consistía en:

- inmunizar ratones con IGF-IR recombinante, con el fin de generar hibridomas,

- cribar los sobrenadantes del cultivo mediante ELISA en la proteína recombinante que sirvió para la inmunización,

- probar todos los sobrenadantes o de hibridomas positivos por ELISA en el receptor nativo sobre-expresado en la superficie de células tumorales MCF-7,

- evaluar los sobrenadantes de hibridomas positivo en los dos primeros cribados en términos de reconocimiento diferencial de IGF-IR e IR en células de insecto infectadas con baculovirus que expresan respectivamente IGF-IR o IR,

- verificar que los anticuerpos seleccionados en esta fase fueran capaces de inhibir *in vitro* la proliferación inducida por IGF1 de las células MCF-7,

- asegurar la actividad *in vivo*, en ratones inmunitariamente desprotegidos, del candidato retenido en términos del impacto sobre el crecimiento del tumor MCF-7.

La totalidad de estas diferentes fases y resultados obtenidos se describirán brevemente a continuación en Ejemplo 1.

Para la fase de inmunización, los ratones se inyectaron dos veces, por vía subcutánea, con 8 μg de IGF-IR recombinante. Tres días antes de la fusión de las células de la rata hembra con las células del mieloma murino Sp20Agl4, los ratones se estimularon por una inyección intravenosa de 3 μg

del receptor recombinante. Catorce días después de la fusión, se cribaron los sobrenadantes de los hibridomas mediante ELISA, en placas sensibilizadas con IGF-IR recombinante. Los hibridomas cuyos sobrenadantes arrojaron positivo se conservaron y amplificaron antes de probarse en el FACScan, con el fin de verificar que los anticuerpos producidos fueran igualmente capaces de reconocer IGF-IR nativo. Para hacer esto, células MCF-7 de un tumor dependiente de estrógeno de la mama, que sobre-expresaban IGF-IR, se incubaron con cada uno de los sobrenadantes de cultivo producidos por los hibridomas seleccionados en ELISA. Los complejos de receptor nativo/MAb en la superficie de la célula se revelaron mediante un anticuerpo de especie secundaria acoplado a un fluorocromo. Figuras 3A a 3C muestran un histograma tipo obtenido del sobrenadante del hibridoma 7C10 (Figura 3C) comparado con una célula con marcación sola + anticuerpo secundario (Figura 3A) o con una marcación que utilizaba un isotipo control (Figura 3B).

En esta fase de la selección, únicamente los hibridomas que segregaban MAb, reconociendo al mismo tiempo el receptor recombinante y el receptor nativo, se seleccionaron y clonaron. El MAb segregado por estos hibridomas se produjo y luego se purificó antes de probarse en el FACScan, de acuerdo con el método ya descrito, en células de insecto Sf9 que expresaban IGF-IR o IR, con el fin de eliminar los hibridomas que reconocían al mismo tiempo los dos receptores. Figura 4A muestra una recuperación total de los histogramas 1, 2, 3 respectivamente, correspondientes a las células no infectadas + anticuerpos secundarios (1), a las células no infectadas marcadas por *α*IR3 + anticuerpos secundarios (2) y a las células no infectadas marcadas por un anticuerpo anti-IR + anticuerpos secundarios (3). Este primer resultado muestra perfectamente la ausencia de IGF-IR e IR detectables en la superficie de estas células de insecto no infectadas. Figura 4B muestra una marcación de células infectadas por un baculovirus que expresa IGF-IR. En esta segunda Figura, el *α*IR3, usado como control positivo, marca perfectamente, como se esperaba, las células (pico 2), mientras que el anti-IR (pico 3) se superpone al pico de células

342
342

solas. Finalmente, en Figura 4C, se muestra el anti-IR marca perfectamente, como se esperaba, las células Sf9 que expresan el IR (pico 3), pero de manera inesperada, el αIR3 descrito en la literatura como específico para IGF-IR parece reconocer asimismo el IR (pico 2).

Los resultados obtenidos en este tercer sistema de cribado se resumen en tabla 1 y muestran la generación de un MAb7C10, que satisface los criterios de reconocimiento del IGF- IR y de no reconocimiento del IR. La isotipificación del Mab7C10 ha mostrado que éste involucra una IgG1.

TABLA 1: Reactividad comparativa de MAb 7C10 en células de insecto Sf9 que expresan IGF-IR o IR

	MFI (Intensidad de fluorescencia media)		
	Células no infectadas	**IGF1R + células**	**IR + células**
Células Anti-IR Anti-IGF-IR (αIR3) EC2 Anti-ratón FITC Medio UltraCulture	8 4.6 9 8 4.3 9	8 9 35 13 9 10	7 91 32 11 13 11
15B9	7.5	25	77.8
9F5D	8	41	40
13G5	7.8	37	24
7C10	8.6	49	13

Los últimos dos cribados permitieron la selección del MAb que consistió en verificar que el último fuera muy capaz de inhibir la proliferación celular inducida por el IGF1 *in vitro* e *in vivo* en la estirpe celular MCF-7.

Para la selección *in vitro*, las células MCF-7 se inocularon, desprovistas de suero bovino fetal, luego se incubaron en la presencia de concentraciones crecientes de IGF1 (de1 a 50 ng/ml) en la presencia o en la ausencia del anticuerpo 7C10 a probarse, agregado a una concentración final de 10 μg/ml. En este experimento, el αIR3 MAb comercial se introdujo como un control positivo y el 7G3 MAb (aislado en paralelo con

el 7C10 y que reconocía débilmente el receptor nativo (MFI en el FACS de 50 comparad con 200 para el MAb 7C10)) como un isotipo control. La proliferación celular se calcula continuando en el contador la incorporación de timidina tritiada por las células. Los resultados se expresan como un índice proliferativo. Los datos presentados en Figura 5 muestran que IGF1 es capaz de estimular, en una manera dependiente de la dosis, proliferación de las células MCF-7. El MAb αIR3, usado como control positivo, inhibe completamente la proliferación de las células MCF-7 inducida por el IGF-I. De la misma manera, el MAb 7C10 inhibe significativamente el crecimiento de las células MCF-7 inducido por IGF-I. Finalmente, el MAb 7G3 usado como un isotipo control resulta perfectamente, como se esperaba, sin efecto sobre el crecimiento de las células tumorales *in vitro* de la célula MCF-7.

La selección *in vivo* se llevó a cabo en un modelo de tumor establecido. Para hacer esto, ratones inmunitariamente desprotegidos recibieron un implante subcutáneo de estrógeno de lenta liberación, indispensable para la inclusión del tumor en un modelo murino. Veinticuatro horas después del implante de los estrógenos, 5.10^6 células MCF-7 se injertan en el costado derecho del ratón por vía subcutánea. Cinco días después de este injerto de células, se miden los tumores y se forman aleatoriamente lotes de 6 ratones. El tratamiento de los ratones se lleva a cabo dos veces por semana, durante 5 a 6 semanas, con 250 μg/dosis/ratón. En el grupo de control, los ratones se tratan en la misma forma con un isotipo control murino. Los resultados presentados en Figura 6A muestran una inhibición muy significativa del crecimiento del tumor, inducida por el anticuerpo 7C10. Esta actividad es particularmente inesperada si se hace referencia a los datos disponibles, concernientes a αIR3, siempre utilizado como referencia en el dominio del receptor para IGF1, y conocido por no tener ninguna actividad *in vivo* sobre el crecimiento de tumores dependientes de estrógeno (ver Figura 6B). Del mismo modo, comparado con los resultados obtenidos con el anticuerpo recombinante scFv-Fc derivado del MAb 1H7 murino (ver Figura 6C), el

MAb 7C10 es mucho más eficaz en la inhibición *in vivo* del crecimiento de las células MCF-7. Esta diferencia de actividad podría relacionarse, sin limitación de ninguna clase, con algunas propiedades particulares de los anticuerpos 7C10 y h7C10, que reconocen el híbrido-R, isoforma(s) A y/o B, (ver Ejemplo 26). Otra hipótesis no exclusiva podría ser el reconocimiento de estos anticuerpos del IGF-IR atípico, como se describe, en el artículo de Siddle et al. (Siddle et al., 1994, Horn Res. 41 (suppl. 2):56-65).

Constantes de disociación de equilibrio (K_D) de una serie de anticuerpos 7C10 y h7C10 dirigidos contra el dominio extracelular del receptor de factor de crecimiento insulinoide tipo I (hIGF-IR) se calcularon por la relación entre constantes de velocidad de asociación y disociación, definidas por resonancia de plasmón de superficie usando un instrumento BIAcore X. La captura de los anticuerpos investigados se empleó para favorecer una presentación apropiada de su sitio de unión a antígeno (Figura 55). Por lo tanto, una mezcla de anticuerpos policlonales Fc IgG anti-ratón en conejo y FC IgG anti-humano en cabra se ligaron covalentemente en ambas celdas de flujo (FC1 y FC2) de un chip de sensor CM5. Típicamente 300 a 400 unidades de resonancia (RU) de cada Mab anti-hIGFl-R se capturaron en FC2 (siendo FC1 una célula de referencia para evaluar interacciones no específicas del analito con la matriz). El analito, correspondiente al dominio extracelular de hIGFl-R, se probó en 5 concentraciones diferentes que variaban de 12.5 a 200nM a 25°C con un caudal de 30 µl/min. Bajo este montaje experimental, se obtuvo una media K_D de 0.86 ± 0.09nM para tres diferentes lotes de A2CHM Mab. Estos valores estuvieron muy cercanos a los obtenidos para el Mab 7C10 de ratón (K_D 0.86 ± 0.14 nM) Tabla 2.

TABLA 2: Constantes de velocidad cinética y constante de disociación de equilibrio para la interacción de hIGF-IR con una serie de anticuerpos monoclonales inmovilizados

345
345

Anticuerpos	k_a x 10^{-5} $M^{-1}s^{-1}$	k_d x 10^{-4} s^{-1}	K_D x 10^{-9} M	χ^2
7C10	1.66±0.01	1.49±0.03	0.897±0.022	
Lote 7	1.82±0.01	1.39±0.03	0.765±0.023	0.631
	1.66±0.01	1.52±0.03	0.920±0.022	1.00
				0.764
Media	**1.71±0.16 ***	**1.47±0.11 ***	**0.86±0.14 ****	
h7C10	1.11±0.01	0.984±0.030	0.886±0.036	
Lote F50035	1.13±0.01	0.953±0.029	0.844±0.034	0.409
BR2.113B	1.12±0.01	0.974±0.029	0.872±0.034	0.407
				0.396
Media	**1.12±0.02 ***	**0.97±0.03 ***	**0.87±0.04 ****	
h7C10	1.04±0.01	0.767±0.030	0.736±0.039	
Lote F50035	1.00±0.01	0.827±0.030	0.827±0.038	0.344
BR2.121A	1.01±0.01	0.837±0.030	0.826±0.038	0.381
				0.395
Media	**1.02±0.04***	**0.81±0.06 ***	**0.80±0.09 ****	
h7C10	1.12±0.01	0.967±0.030	0.863±0.034	
Lote F50035	1.14±0.01	1.04±0.03	0.913±0.035	0.403
BR2.113A	1.12±0.01	1.04±0.03	0.927±0.035	0.464
				0.470
Media	**1.13±0.02***	**1.02±0.07 ***	**0.90±0.08 ****	

Las constantes de velocidad k_a y k_d se determinaron para cada conjunto de datos usando el algoritmo de ajuste global descrito en el software de evaluación 3.1 BIA y con base en un modelo de unión 1: 1 de Langmuir sin incorporar un término de transporte de masas. La calidad del ajuste global a los datos experimentales se indica por el valor χ^2.

* Los intervalos de confianza del 95% de las velocidades cinéticas se calcularon usando la fórmula $SE = \sigma/3^{1/2} \times 2.920$

** Los intervalos de confianza de la K_D se calcularon usando la fórmula $SE(K_D)=[SE(k_a) \times k_d + k_a \times SE(k_d)]/k_a$

Ejemplo 2: Comparación del efecto de 7C10 y tamoxifeno sobre el crecimiento *in vivo* del tumor MCF-7

Con el fin de determinar la efectividad del tratamiento por el anticuerpo 7C10 en el contexto de cáncer dependiente de estrógeno de la mama, se comparó 7C10 con el compuesto tamoxifeno empleado

346
346

actualmente para el tratamiento de carcinoma mamario en el contexto de formas desarrolladas con evolución local y/o metastásica y en el contexto de la prevención de recurrencias (ver VIDAL 2000, páginas 1975-1976).

En neoplasias malignas dependientes de hormonas de la mama, existe una correlación significativa entre la expresión de los receptores para estrógenos (ER) y la del IGF-IR (Surmacz E. et al., Breast Cancer Res. Treat., Feb., 47(3):255-267, 1998). Más aún, parece que los estrógenos (E2) actúan en sinergia con IGF1 (a veces escrito IGF-I o IGFI) con el fin de estimular la proliferación celular. En efecto, se ha demostrado que un tratamiento con E2 aumenta aproximadamente 10 veces el nivel mARN de IGF-IR, así como el nivel de expresión de la proteína (Lee A.V. et al., Mol. Endocrinol., May, 13(5):787-796, 1999). Este incremento se manifiesta por un aumento significativo en la fosforilación del IGF-IR. Adicionalmente, el E2 estimula significativamente la expresión de IRS-1 ("IRS-1" significa "Sustrato -1 de Receptor de Insulina"), que es uno de los sustratos del IGF-IR fosforilado.

El tamoxifeno se ha empleado ampliamente durante muchos años en la terapia hormonal para el tratamiento de pacientes aquejados de neoplasias malignas dependientes de E2 (Forbes J.F., Semin. Oncol., Feb., 24 (1st Suppl. 1):S1-5-S1-19, 1997). Esta molécula entre en competencia con el estradiol e inhibe la fijación éste a su receptor (Jordan V.C., Breast Cancer Res. Treat., 31(1):41-52, 1994). Se ha demostrado además que el tamoxifeno es capaz de inhibir la proliferación dependiente de IGF-IR reprimiendo la expresión del receptor y su fosforilación (Guvakova M.A. et al., Cancer Res., July 1, 57(13):2606-2610, 1997). Estos datos, en su totalidad, parecen indicar que el IGF-IR es un mediador importante de la proliferación inducida por la interacción de E2/ER.

El uso a largo plazo del tamoxifeno se asocia con un aumento significativo en el riesgo de cáncer del endometrio (Fisher et al., J. of National Cancer Institute, 86, 7:527-537, 1994; VIDAL 2000, 1975-1976) y de recurrencia colateral de cáncer independiente de E2 de la mama (Li C.I. et al., J. Natl. Cancer Inst., July 4, 93(13):1008-1013, 2001). En este

contexto, una comparación del efecto antitumoral *in vivo* del anticuerpo 7C10 y del tamoxifeno se ha llevado a cabo en el modelo MCF-7, con el fin de determinar la parte de la actividad conectada con IGF-IR en la proliferación medida por ER. Para hacer esto, 7.10^6 células MCF-7 se implantaron sc (subcutáneamente) en ratones inmunitariamente desprotegidos, 24 horas después del implante en estos ratones de un grano de estradiol con liberación prolongada (0.72 mg/tableta liberados durante 60 días), indispensable para el establecimiento de cualquier tumor humano dependiente de E2 en esta especie animal. Cinco días después de este implante, se miden los tumores y se forman grupos de 6 ratones. Estos grupos se tratan respectivamente con 1) el anticuerpo 7C10 inyectado i.p. (intraperitonealmente) a una tasa de 250 μg/ratón, dos veces por semana, 2) 10 μg de tamoxifeno tomado en PBS que contenía 3% de hidroxipropil-celulosa (HPC) ip ó 3) el disolvente en el cual se toma el tamoxifeno (hidroxipropilcelulosa). El tamoxifeno se administra diariamente durante 4 semanas, excepto los fines de semana. Los ratones tratados con el MAb 7C10 recibieron asimismo diariamente una inyección de PBS con 3% HPC. Previamente se llevó a cabo un estudio con el fin de verificar que el disolvente solo no tenga influencia sobre el crecimiento del tumor.

Los resultados presentados en Figura 7 muestran que el MAb 7C10 es capaz de inhibir significativamente el crecimiento del tumor MCF-7 *in vivo* (los asteriscos (*) corresponden a la comparación grupo de control/grupo 7C10 en una prueba *t*). En forma sorprendente, el anticuerpo 7C10 parece ser significativamente más eficaz que el tamoxifeno para la inhibición del crecimiento del tumor (los círculos ( ) corresponden a la comparación grupo tamoxifeno/grupo 7C10 en una prueba *t*) sugiriendo que este tipo de tratamiento por MAB podría sustituir al tratamiento con tamoxifeno.

Ejemplo 3: Demostración de la actividad antitumoral del MAb 7C10 *in vivo* en tumores humanos de diferentes orígenes

a) Actividad *in vivo* del anticuerpo 7C10 en 4 modelos tumorales

Con el fin de generalizar la actividad del anticuerpo 7C10 con otros tumores que expresan el receptor para IGF1, 7C10 se probó *in vivo* en un modelo independiente de andrógeno de tumor de la próstata DU145 (escrito igualmente DU-145), en un modelo osteosarcoma SKES-1, en un modelo de tumor amicrocítico del pulmón A549 y en un modelo de cáncer pancreático BxPC3. El protocolo es comparable con el ya descrito para MCF-7, y los resultados presentados en Figuras 8A - 8D muestran una actividad significativa de este MAb en los 4 modelos tumorales. La actividad observada en el modelo de tumor de la próstata hay registrarla muy particularmente en la medida en que la cadena única cFv del MAB1H7 carece de actividad en un modelo, independiente de andrógeno, de tumor de la próstata (Li et al., 2000).

b) Actividad *in vivo* del anticuerpo 7C10en un modelo ortotópico A549

Los modelos convencionales de xenoinjerto, ya descritos, no permiten el estudio de medicamentos sobre la diseminación metastásica. En efecto, los tumores implantados s.c. (subcutáneamente) permanecen localizados a la vista de la inyección y, por lo tanto no reflejan realmente la situación en el hombre. Con el fin de evaluar nuestro anticuerpo en un modelo más cercano a la realidad, las células A549 se implantaron en un sitio intrapleural. Este modelo, muy bien descrito en (Clin. Cancer Res., 2000, Jan. 6(1):297-304), permite una diseminación metastásica cercana a la observada en el hombre, con metástasis mediastinales, pulmonares, cardiacas y vertebrales. En el estudio llevado a cabo, 10^6 células A549 se inyectaron intrapleuralmente en ratones hembra inmunitariamente desprotegidos. 7 días después del implante, los ratones se dividieron en 2 lotes de 22. Uno de estos lotes recibió una dosis de prueba de provocación de respuesta (***"a challenge dose"***) de 500 μg/ratón y se trató luego dos veces por semana con una tasa de 250 μg de 7C10/dosis. El segundo lote se trató de acuerdo con el mismo esquema con el isotipo control 9G4. Figura 31 muestra una extensión significativa de la supervivencia en los ratones

tratados con el MAB 7C10, indicando que este anticuerpo puede tener una acción sobre la diseminación metastásica.

Ejemplo 4: Comparación del MAb 7C10 con navelbina *in vivo*; efecto de una administración conjunta de los dos tratamientos

La navelbina es un compuesto de quimioterapia indicado en cáncer amicrocítico del pulmón y en cáncer metastásico de la mama. El estudio comparativo de 7C10 y navelbina, y la posible sinergia entre los dos productos se estudió en el modelo tumoral A549. Para este estudio, 5.10^6 células A549 se injertaron subcutáneamente en el costado derecho del ratón. Cinco días después del injerto de las células, los tumores se miden y se inician los tratamientos con MAb y/o navelbina. La dosis de MAb es siempre 250, μg/dosis/ratón, dos veces por semana, intraperitonealmente. En lo concerniente a la navelbina, esta se administrará con la dosis máxima tolerada por el ratón o 10 mg/kg, intraperitonealmente. Para este tratamiento, se aplicarán tres inyecciones en intervalos de 7 días. Durante las administraciones conjuntas, los dos productos se mezclan antes de la inyección.

Los resultados presentados en Figura 9 muestran en forma sorprendente que, en este modelo, el anticuerpo 7C10 es tan activo como el tratamiento convencional con navelbina. Se observa igualmente una sinergia muy significativa de los dos productos, con cinco ratones de los siete no teniendo tumores cuantificables el día 72.

Ejemplo 5: Estudio de la inhibición *in vitro* del crecimiento inducido por IGF2 de los tumores MCF-7

Como ya se indicó, IGF-IR se sobre-expresa por numerosos tumores pero, por otra parte, se ha descrito que una buena parte de las neoplasias malignas de la mama y del colon especialmente, la señal de proliferación se da a este receptor mediante IGF2 (a veces escrito IGF-II o IGFII). Por consiguiente, es esencial garantizar que le MAb 7C10 sea igualmente capaz de inhibir el crecimiento IGF2 inducido en el tumor MCF-7 *in vitro*. Para

hacerlo, se inocularon células en placas de 96 pocillos, desprovistas de suero bovino fetal y se estimularon por la adición de 200 ng de IGF2 por ml, concentración final, de medio, en la presencia y en la ausencia del MAb a probarse, introducido en una concentración de 10 μg/ml. Los resultados presentados en Figura 10 muestran que IGF2, al igual que IGF1, estimula significativamente el crecimiento de las células MCF-7. La adición de un isotipo control, 9G4, carece de efecto sobre esta estimulación. Como ya se describió por De Léon et al. (Growth Factors, 6:327-334, 1992), no se observa efecto durante la adición del MAb αIR3. De otro lado, 7C10 inhibe totalmente el crecimiento inducido por IGF2. Su actividad es significativamente mejor que la de 1H7.

Ejemplo 6: Actividad biológica de los anticuerpos 7C10 quiméricos (C7C10) y 7C10 humanizados (h7C10)

a) Comparación de 7C10/C7C10 y 7C10/h7C10 en el modelo MCF-7 *in vitro*

La forma quimérica del MAb 7C10 y la forma 1 humanizada purificada (escrita aquí 7H2HM) se probaron *in vitro* en el modelo MCF-7, como ya se describió. Los resultados presentados respectivamente en Figuras 11 y 12 muestran que estas dos formas han preservado perfectamente sus propiedades de inhibir el crecimiento, inducido por IGF1, del tumor MCF-7.

Para determinar los valores IC_{50} del anticuerpo h7C10, se ha probado *in vitro* un rango de dosis de anticuerpos de varios lotes en el ensayo proliferativo inducido por IGF1.

Los resultados descritos en Figura 56 demuestran que todos los lotes probados son comparables y presentan valores IC_{50} cercanos a 0.3 nM. Estos datos están de acuerdo con los valores K_D determinado por el análisis Biacore y descritos al final de Ejemplo 1.

Para determinar los valores IC_{50} del anticuerpo h7C10, se ha probado *in vitro* un rango de dosis de anticuerpos de varios lotes en el ensayo proliferativo inducido por IGF2. Los resultados descritos en Figura 60

demuestran que todos los lotes probados son comparables y presentan valores IC_{50} cercanos a 0.3 nM. Estos valores IC_{50} son cercanos al obtenido en el ensayo proliferativo inducido por IGF1, ya descrito.

b) Efecto comparativo de MAb7C10 y h7C10 sobre la transducción de la señal inducida por la unión de IGF1 a su receptor

La actividad de la inhibición del crecimiento IGF1 inducido *in vitro* en la estirpe MCF-7 tiene que ser la traducción de una inhibición de la transducción de la señal mediada por IGF1 durante la unión del MAb 7C10 al receptor. Con el fin de verificar esta hipótesis, células MCF-7 se incubaron con o sin IGF1, en la presencia o en la ausencia de los anticuerpos a probarse. Luego de un corto tiempo de incubación, la células se sometieron a lisis, se inmunoprecipitó la cadena β y se calculó la fosforilación de esta subunidad con la ayuda de un anticuerpo antifosfotirosina cinasa. Los resultados presentados en Figura 13 muestran que la unión del 7C10 o el h7C10 inhibe significativamente la fosforilación de la subunidad β de IGF-IR, contrario a un anticuerpo murino (9G4) o humano irrelevante (escrito IgG1 en el esquema).

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

La inhibición de la transducción de la señal ya descrita en el párrafo b) es el principal mecanismo de acción involucrado en la actividad biológica de los anticuerpos 7C10 y 7H2HM. No obstante, es probable que durante su administración al hombre, el anticuerpo 7H2HM, de isotipo IgG1, sea capaz de inducir lisis celular por un mecanismo de tipo ADCC (Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo). Con el fin de verificar este punto, linfocitos NK (citolíticos naturales) provenientes de la sangre periférica de donantes humanos se ponen en la presencia de células A549 ó MCF-7 previamente incubadas durante 4 horas con 10 μg de anticuerpo 7H2HM por 5.10^5 células y marcadas con ^{51}Cr (50 μg). En este experimento, herceptina (escrita h4D5 en Figuras 32A y 32B) se emplea como control positivo de experimento. Figuras 32A - 32D muestran que, como se esperaba, la herceptina induce una ADCC significativa en las dos células A549 y MCF-7 (ver respectivamente Figuras 32A y 32B). 7H2HM

es igualmente capaz de inducir una ADCC en las células A549 (ver Figura 32C), pero este fenómeno es de menor amplitud en la células MCF-7 (ver Figura 32D).

Observando el presente ejemplo, sería evidente para una persona experta en el arte probar, en la misma manera, otras funciones efectoras tales como, por ejemplo, CDC.

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

La inhibición del crecimiento celular observada *in vitro* en la estirpe MCF-7 debe manifestarse por un efecto sobre el ciclo celular. Con el fin de responder a esta pregunta, 4.10^5 células se inoculan en placas de 6 pocillos. 24 horas después de la inoculación, el suero bovino se retira y se agrega IGF1 en la presencia o en la ausencia de los anticuerpos a ensayar. Luego de la incubación durante 24 horas, las células se recuperan para el estudio del ciclo celular. Figura 33B demuestra el efecto de IGF1 sobre la entrada en el ciclo y el crecimiento de las células MCF-7 comparada con la entrada en el ciclo celular y el crecimiento de las células MCF-7 en la ausencia de IGF1 (ver Figura 33A). Luego de la adición del factor de crecimiento, se observa una disminución significativa en la fase G0/G1 (de 88.2% a 56.3%) en beneficio de las fases S (de 7.8% a 31%) y G2/M (de 4% a 12.7%). Durante la adición de los anticuerpos 7C10 y 7H2HM (ver Figura 33C), se observa una inhibición significativa de la entrada en el ciclo celular. En esto hay que anotar que el anticuerpo murino y su homólogo humanizado tienen una actividad comparable en el ciclo celular. El αIR3, introducido como control positivo, parece ligeramente menos activo que el 7C10 y el 7H2HM en esta prueba. El anticuerpo 9G4 usado como isotipo control carece de efecto sobre el ciclo celular.

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

Con el fin de confirmar la actividad del anticuerpo humanizado 7H2HM *in vivo*, éste último se comparó con 7C10 en el modelo de tumor amicrocítico del pulmón A549. Este experimento se llevó exactamente a cabo como se describe anteriormente, excepto por la dosis de anticuerpo

que es 125 μg/dosis, dos veces por semana en lugar de 250 μg/dosis dos veces por semana, y por el hecho de la no disponibilidad de grandes cantidades de 7H2HM. El anticuerpo 9G4 se usó como isotipo control para 7C10, y una inmunoglobulina humana irrelevante de isotipo IgG1 (designada más adelante HIgG1) se usó como control para el anticuerpo humanizado 7H2HM.

Figura 34A muestra que no hay diferencias significativas entre las curvas de control 9G4 y HIgG1. Como se esperaba, se observa una inhibición significativa del crecimiento del tumor con el anticuerpo murino 7C10. En lo que concierne al anticuerpo humanizado 7H2HM, la actividad observada es de exactamente la misma intensidad a la observada con su contraparte murina. Estos datos, además de las observaciones ya descritas *in vitro*, indican que la humanización no ha modificado las propiedades del anticuerpo generado. De otra parte, en los modelo de xenoinjerto en el ratón, la actividad del anticuerpo humanizado parece estar integralmente conectado con un mecanismo de inhibición de la transducción de la señal. En efecto, si una parte de ADCC estaba en juego en la inhibición del crecimiento del tumor en el ratón inmunitariamente desprotegido, tenía que observarse una diferencia entre la actividad de los anticuerpos murinos y humanizados.

Un experimento *in vivo* se llevó igualmente a cabo en el modelo de tumor de mama MCF-7 y muestra que, como se esperaba, el anticuerpo 7H2HM es perfectamente comparable con el anticuerpo murino 7C10 para la inhibición del crecimiento de este tumor *in vivo* (Figura 34B).

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

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

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

354

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

Tal como se indica más arriba, IGF-IR es capaz de conferir protección contra apoptosis cuando se sobre-expresan en la superficie de las células. Además, se ha demostrado en estos ejemplos que los anticuerpos 7C10 y 7H2HM fueron capaces de potenciar un compuesto activo en quimioterapia. Con el fin de probar el poder de los anticuerpos 7C10 y 7H2HM de inducir apoptosis, y explicar en parte su potencial de sinergia con la quimioterapia, se realizaron experimentos en las células MCF-7 en la presencia o en la ausencia de doxorubicina, un medicamento conocido por inducir la apoptosis de esta estirpe celular *in vitro*. En estos experimentos, las células MCF-7 se inoculan a $2.10^4/cm^2$ en placas de Petri y se cultivan durante 24 horas en RPMI sin rojo fenol suplementado con 10% de suero bovino fetal (FCS). Las células se lavan entonces dos veces con PBS y se regresan al cultivo en medio con 0% FCS. Se les deja un tiempo de adaptación de 10 minutos a 37°C antes de la adición de los anticuerpos a 10 µg/ml. Luego de un tiempo extra de 10 minutos a 37°C, se agrega IGF1 recombinante (Sigma) al medio de cultivo en una concentración final de 50 ng/ml. Nuevamente las células se dejan a 37°C durante una hora, con el fin de permitir la unión de los anticuerpos y del IGF-I. Finalmente, se agrega la doxorubicina (Sigma) al medio de cultivo a 2 µg/ml, y las células se incuban durante 24 horas a 37°C.

En igual forma, los experimentos se han conducido con navelbina en una concentración de 10 µg/ml.

El análisis de la viabilidad celular se lleva a cabo por análisis citométrico de flujo luego de marcar con la anexina V-FITC (20 minutos, 4°C) y DAPI (2 µg/ml). El porcentaje considerado de células muertas es la población marcada Anexina + / DAPI +. El anticuerpo 5C2 se usa como isotipo control.

Los resultados representados en Figura 36 muestran que la doxorubicina induce apoptosis en 8% de las células MCF-7. Cuando las células se tratan conjuntamente con el anticuerpo 7C10 y la doxorubicina,

se observa un incremento significativo de muerte celular. El mismo efecto se muestra con el anticuerpo 7H2HM. El mismo tipo de resultados se observó cuando el anticuerpo se combina con navelbina.

Ejemplo 7: Estrategia de clonación de genes que codifican las regiones variables de las cadena ligeras y pesadas del anticuerpo monoclonal (MAb) 7C10

El ARN total se extrajo de 10^7 células de hibridomas que segregan el anticuerpo 7C10 usando el TRI REAGENT™ (de acuerdo con las instrucciones impartidas por el proveedor, SIGMA, T9424). La primera hebra de cADN se sintetizó con la ayuda del kit 'First strand cADN synthesis' de Amersham-Pharmacia (#27-9621-01, de acuerdo con las instrucciones impartidas por el proveedor). Para las dos cadenas, la reacción se cebó con el oligonucleótido Not I-d(T)18, contenido en el kit.

El híbrido cADN:mARN se obtuvo así para la amplificación por PCR de los genes que codifican para las cadenas ligeras y pesadas del Mab 7C10. La PCR se llevó a cabo usando una combinación de oligonucleótidos específicos para las cadenas ligeras (Kappa) y pesadas de inmunoglobulinas de ratón. Los cebadores correspondientes de los extremos 5' hibridan en la región correspondiente a los péptidos de señal (Tabla 3 para cadenas pesadas, Tabla 4 para cadenas ligeras). Estos cebadores se compilaron de un gran número de secuencias de anticuerpo de ratón halladas en las bases de datos (Jones S.T. et al., Bio/Technology 9:88-89, 1991). Los cebadores correspondientes a los extremos 3' hibridan las regiones constantes de las cadenas pesadas (dominio CH1 de la subclase IgG1, no lejos de la unión V-C, cebador MHC-1 Tabla 5) y cadenas ligeras (dominio Kappa no lejos de la unión V-C, cebador MKC Tabla 5).

TABLA 3: Cebadores de oligonucleótidos para la región 5' de los dominios variables de las cadenas pesadas de inmunoglobulina de ratón (MHV) ("MHV" significa "Variable Pesada de Ratón")

356
356

MHV-1:	5' ATGAAATGCAGCTGGGTCATSTTCTT 3'	(SEQ ID No. 13)
MHV-2:	5' ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT 3'	(SEQ ID No. 14)
MHV-3:	5' ATGAAGWTGTGGTTAAACTGGGTTTT 3'	(SEQ ID No. 15)
MHV-4:	5' ATGRACTTTGGGYTCAGCTTGRT 3'	(SEQ ID No. 16)
MHV-5:	5' ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTT 3'	(SEQ ID No. 17)
MHV-6:	5' ATGGCTGTCYTRGSGCTRCTCTTCTG 3'	(SEQ ID No. 18)
MHV-7:	5' ATGGRATGGAGCKGGRTCTTTMTCTT 3'	(SEQ ID No. 19)
MHV-8:	5' ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG 3'	(SEQ ID No. 20)
MHV-9:	5' ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCTATT 3'	(SEQ ID No. 21)
MHV-10:	5' ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCCT 3'	(SEQ ID No. 22)
MHV-11:	5' ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG 3'	(SEQ ID No. 23)
MHV-12:	5' ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCT 3'	(SEQ ID No. 24)
NB KEY: R=A/G, Y=T/C, W=A/T, K=T/G, M=A/C, S=C/G.		

TABLA 4: Cebadores de oligonucleótidos para la región 5' de los dominios variables de las cadenas kappa (ligeras) de inmunoglobulina de ratón (MKV) ("MKV" significa "Variable Kappa de Ratón")

MKV-1:	5' ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT 3'	(SEQ ID No. 25)
MKV-2:	5' ATGGAGWCAGACACACTCCTGYTATGGGT 3'	(SEQ ID No. 26)
MKV-3:	5' ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCT 3'	(SEQ ID No. 27)
MKV-4:	5' ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGG 3'	(SEQ ID No. 28)
MKV-5:	5' ATGGATTTWCAGGTGCAGATTWTCAGCTT 3'	(SEQ ID No. 29)
MKV-5A:	5' ATGGATTTWCARGTGCAGATTWTCAGCTT 3'	(SEQ ID No. 30)
MKV-6:	5' ATGAGGTKCYYTGYTSAGYTYCTGRG 3'	(SEQ ID No. 31)
MKV-7:	5' ATGGGCWTCAAGATGGAGTCACA 3'	(SEQ ID No. 32)
MKV-8:	5' ATGTGGGGAYCTKTTTYCMMTTTTTCAAT 3'	(SEQ ID No. 33)
MKV-9:	5' ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTT 3'	(SEQ ID No. 34)
MKV-10:	5' ATGTATATATGTTTGTTGTCTATTTC 3'	(SEQ ID No. 35)
MKV-11:	5' ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTT 3'	(SEQ ID No. 36)
MKV-12A:	5' ATGRAGTYWCAGACCCAGGTCTTYRT 3'	(SEQ ID No. 37)
MKV-12B:	5' ATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGT 3'	(SEQ ID No. 38)

MKV-13:	5' ATGGATTCACAGGCCCAGGTTCTTAT 3'	(SEQ ID No. 39)
NB KEY: R=A/G, Y=T/C, W=A/T, K=T/G, M=A/C, S=C/G.		

TABLA 5: Cebadores de oligonucleótidos para los extremos 3' de los genes V_H y V_L de ratón

Cadena ligera (MKC):

5' ACTGGATGGTGGGAAGATGG 3' (SEQ ID No. 40)

Región constante del dominio Kappa de ratón:

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

Cadena pesada (MHC-1)

5' CCAGTGGATAGACAGATG3' (SEQ ID No. 44)

Dominio CH1 gamma-1 (subclase IgG1) de ratón:

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

Ejemplo 8: Secuencias de inmunoglobulinas clonadas del hibridoma 7C10 de ratón

Siguiendo la estrategia de amplificación ya descrita, productos PCR correspondientes a las regiones variables de las cadenas ligeras (VL) y pesadas (VH) se clonaron usando los "pGEM®-T Easy Vector Systems" (Promega). Para 7C10 VL, se obtuvieron productos PCR con el cebador MKC en combinación con los cebadores MKV1 y MKV2. Para 7C10 VH, se obtuvieron productos PCR con el cebador MHC-1 en combinación con los cebadores MHV8 y MHV12. Una secuenciación exhaustiva de los productos PCR clonados en los vectores fáciles pGem-T reveló dos secuencias diferentes para la cadena ligera y una secuencia única para la cadena pesada.

a) Región variable aislada del oligo MKV1

La secuencia de ADN obtenida es característica de una región variable de Ig funcional. Por lo tanto, se presume que esta novedosa secuencia es la que codifica para 7C10 VL. Las secuencias de ADN (SEQ ID No. 48 y 50) y aminoácidos (SEQ ID No. 49) del cADN que codifica para 7C10 VL se representan en Figura 14.

b) Región variable aislada del oligo MKV2

El gen que codifica para esta cadena ligera proviene de un transcripto de mARN aberrante que está presente en todas las parejas de fusión estándar, derivadas del tumor MOPC-21 original del cual es parte el mieloma de ratón Sp2/Oag14, que se empleó con el fin de producir el hibridoma 7C10. Esta secuencia contiene una recombinación aberrante entre los genes V y J (eliminación de cuatro bases de nucleótidos que implican un cambio en el marco de lectura) y una mutación de la cisteína invariable en posición 23 a tirosina. Estos cambios sugieren que esta cadena ligera sería no funcional, aunque sin embargo transcrita al ARN mensajero. La secuencia de ADN de esta cadena pseudoligera no se muestra.

c) Región variable aislada de los oligos MHV8 y MHV12

Las secuencias de ADN obtenidas con estos dos oligos son idénticas, aparte de la secuencia codificada por el oligo mismo. Esta secuencia es una secuencia novedosa que codifica para la cadena pesada funcional que se presume ser la del anticuerpo monoclonal 7C10. Las secuencias de ADN (SEQ ID No. 51 y 53) y aminoácidos (SEQ ID No. 52) del cADN que codifica para 7C10 VH se representan en Figura 15.

Ejemplo 9: Construcción de genes quiméricos ratón-hombre

El anticuerpo quimérico 7C10 se construyó de modo que tuviera las regiones VL y VH 7C10 de ratón conectadas a las regiones constantes humanas kappa y gamma-1, respectivamente. Se emplearon oligos con el fin de modificar los extremos 5' y 3' de las secuencias que flanquean el ADN que codifica para VL y VH 7C10 con el fin de permitir su clonación

en vectores para expresión en células mamíferas. Estos vectores utilizan el promotor fuerte HCMV para transcribir efectivamente las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo quimérico 7C10. Por otra parte, estos vectores contienen igualmente el origen de replicación de SV40 que permite una replicación efectiva del ADN y, como consecuencia, como una expresión transitoria de las proteínas en células cos.

Ejemplo 10: Expresión y evaluación de la actividad de reconocimiento del receptor IGF1 del anticuerpo quimérico 7C10

Los dos plásmidos que contienen el ADN que codifica para el anticuerpo 7C10 quimérico se co-transfectaron en células cos-7 (número ATCC CRL-1651) con el fin de estudiar la expresión transitoria del anticuerpo recombinante. Luego de la incubación durante 72 horas, se retiró el medio de cultivo, se centrifugó con el fin de eliminar los desechos de células y se analizó por la técnica ELISA para la producción de IgG1 humana (ver Ejemplo 16) y el reconocimiento del receptor para IGF1 (ver Ejemplo 17).

Las pruebas ELISA para la medición de concentraciones de IgG1/Kappa humana mostraron que la expresión del anticuerpo quimérico 7C10 en las células cos-7 estaba entre 300 y 500 ng/mm, que es comparable con los valores obtenidos con la mayoría de los anticuerpos.

Las pruebas ELISA para el reconocimiento del receptor de IGF1 muestran que el anticuerpo quimérico lo reconoce específicamente y una avidez relativa buena (ver Figuras 3A, 3B y 3C). Esto aporta la prueba funcional que las VH y VL buenas del anticuerpo 7C10 se han identificado. Adicionalmente, esta forma quimérica de 7C10 aparece como un herramienta indispensable en la evaluación de la afinidad de las formas humanizas.

Ejemplo 11: Modelado molecular de las regiones variables del anticuerpo 7C10 de ratón

Con el fin de contribuir a refinar el proceso de humanización por "injerto CDR ", se construyó un modelo molecular de las regiones VL y VH del anticuerpo 7C10 de ratón. El modelo se basa en la estructura cristalográfica de la cadena pesada 1AY1 y de la cadena ligera 2PCP.

Ejemplo 12: Proceso de humanización por injerto CDR de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo 7C10 (7C10 VL)

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

Como paso preliminar a la humanización por injerto CDR, la secuencia de aminoácidos de 7C10 VL se comparó primeramente con todas las secuencias VL de ratón presentes en la base de datos de Kabat (dirección en Internet: ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/database/kabat/fasta_format/, última actualización de los datos de 1999). Se ha identificado así 7C10 VL como perteneciente al subgrupo II de las cadenas ligeras Kappa, como se define por Kabat et al. (en *Sequences of proteins of immunological interest* (5th edn.), NIH publication No. 91-3242, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, 1991). Las regiones VL de anticuerpos monoclonales de ratones con una identidad de secuencia, que va hasta el 95%, se han identificado (DRB1-4.3 (SEQ ID No. 55): 95% y C94-5B11'CL (SEQ ID No. 56): 95%, ver Figura 17). Con el fin de tratar de identificar los residuos extraordinarios en la secuencia 7C10 VL, la secuencia de aminoácidos de 7C10 VL (SEQ ID No. 54) se alineó con la secuencia de consenso del subgrupo II de las cadenas kappa de ratón (SEQ ID No. 57) como se define por Kabat (ver Figura 17).

En la posición número 3 de Kabat, la valina (V) presente normalmente en el subgrupo II de las cadena ligeras Kappa de acuerdo con Kabat (71%) se reemplaza por una leucina (L). Una leucina en esta posición no es rara puesto que se encuentra, por ejemplo, en DRB1-4.3 y C94-5B11'CL. De acuerdo con el modelo molecular, este residuo no parece

jugar un papel particular. En consecuencia, no se contemplará la conservación de este residuo en la forma humanizada.

En la posición número 7 de Kabat, la treonina (T) presente normalmente en el subgrupo II de las cadenas ligeras Kappa de acuerdo con Kabat (66%) se reemplaza por una iso-leucina (I). Una isoleucina en esta posición es relativamente rara puesto que no sólo se encuentra 15 veces entre todas las secuencias VL de ratón conocidas y jamás entre las secuencias VL humanas. El modelo molecular muestra que este residuo (17) apunta hacia la superficie de la molécula pero no contacta las CDRs (el residuo de una CDR que es la más próxima sería la arginina en la posición número 42 de Kabat). Adicionalmente, no parece muy probable que este residuo 17 contacte directamente el antígeno. En consecuencia, no se contemplará la conservación de este residuo en la forma humanizada, en ningún porcentaje, por el momento.

En la posición número 77 de Kabat, la arginina (R) normalmente presente en el subgrupo II de las cadenas ligeras Kappa de acuerdo con Kabat (95.5%) se remplaza por una serina (S). Una serina en esta posición no es rara.

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

Con el fin de identificar el mejor candidato humano para el "injerto CDR", se buscó la región VL Kappa de origen humano que tiene la mayor homología posible con 7C10 VL. A este fin, la secuencia de aminoácidos de 7C10 VL Kappa de ratón se comparó con todas las secuencias VL Kappa humanas presentes en la base de datos de Kabat. 7C10 VL de ratón tuvo la mayor homología de secuencia con las regiones VL Kappa humanas del subgrupo II, como se define por Kabat et al. (1991). Se han identificado regiones VH de anticuerpos monoclonales de origen humano que tienen una identidad de secuencia que va hasta 75.9% (GM607 (SEQ ID No. 58), ver Figura 18) en la totalidad de los 112 aminoácidos que componen la región variable. Se identificó asimismo una estirpe germinal de origen humano,

DPK15/A19 (SEQ ID No. 59), que poseía una identidad de secuencia de 76% (ver Figura 18), GM607 (Klobeck et al., 1984). Por lo tanto se escogió GM607 como una secuencia humana receptora de CDRs (de acuerdo con la definición de Kabat) de 7C10 VL de ratón. Comparando las secuencias GM607 con la secuencia de consenso del subgrupo humano II (SEQ ID No. 60) (Figura 18), no pudo identificarse un residuo particular en las regiones marco (Rch), indicando por el mismo hecho que GM607 era un excelente candidato para injerto CDR.

c) Versiones humanizadas de 7C10 VL

La siguiente etapa en el proceso de humanización consistió en juntar las CDRs de 7C10 VL de ratón a las regiones marco (Rch) de la cadena ligera humana seleccionada, GM607 (Klobeck et al., 1984). En esta etapa del proceso, el modelo molecular de las regiones Fv de ratón de 7C10 es particularmente útil en la elección de los residuos de ratón a conservarse como capaces de jugar un papel en el mantenimiento de la estructura tridimensional de la molécula (estructura canónica de las CDRs, interface VH/VL, etc.) o en la fijación al antígeno. En las Rchs, cada diferencia entre el (7C10 VL) de ratón y (GM607) humano, los aminoácidos se examinaron escrupulosamente (ver Tabla 6). Adicionalmente, los residuos particulares en la secuencia de ratón 7C10 VL que se identificaron (ver ejemplo 12. a) se tomaron en cuenta, si fuera necesario.

En la primera versión humanizada por "injerto CDR" de 7C10 VL, humano 1, se llevó a cabo un solo cambio en las regiones marco (Rch) de GM607. Este cambio concierne al 2 (nomenclatura de Kabat) situada en Rch 1. Este residuo entra en efecto en la composición de la estructura canónica de la CDR 1 de 7C10 VL y, por lo tanto, podría ser crítico para mantener este lazo en su buena conformación. Por consiguiente, la valina presente en esta posición en la secuencia 7C10 VL de ratón se conserva en esta misma posición en la forma humanizada (ver Tabla 6 y Figura 19 para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 61) y Figura 20 para la secuencia

363
363

de ADN (SEQ ID No. 62 y 64) y la secuencia de aminoácidos que comprende la señal de péptidos (SEQ ID No. 63).

En la segunda versión humanizada por "injerto CDR" de 7C10 VL, humano 2, no se hizo ningún cambio en las Rchs de la cadena ligera humana GM607. Por consiguiente, todos los residuos de las Rchs son de origen humano, incluido el residuo 2 que se ha mudado por lo tanto con el fin de reemplazar la valina presente en el 7C10 VL de ratón por una isoleucina encontrada en esta misma posición en la cadena ligera humana GM607 (ver Tabla 6 y Figura 19 para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 65) y Figura 21 para la secuencia de ADN (SEQ ID No. 66 y 68) y la secuencia de aminoácidos que comprende la señal de péptidos (SEQ ID No. 67)). Por lo tanto, esta forma 2 humana es totalmente humanizada (aparte de, lógicamente, las CDRs mismas) puesto que todos los residuos de las Rchs son aquellas de la cadena liviana de origen humano, GM607.

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

Kabat	#	FR o CDR	Cadena ligera de ratón 7C10	Estirpe germinal humana DPK15/A19	GM 607	7C10 1 humano remodelado	7C10 2 humano remodelado	Comentarios
1	1	FR1	D	D	D	D	D	
2	2	|	V*	I*	I*	V*	I*	Cano L1 4(16) zona Vernier
3	3	|	L	V	V	V	V	
4	4	|	M	M	M	M	M	zona Vernier
5	5	|	T	T	T	T	T	
6	6	|	Q	Q	Q	Q	Q	
7	7	|	I	S	S	S	S	
8	8	|	P	P	P	P	P	
9	9	|	L	L	L	L	L	
10	10	|	S	S	S	S	S	
11	11	|	L	L	L	L	L	
12	12	|	P	P	P	P	P	
13	13	|	V	V	V	V	V	
14	14	|	S	T	T	T	T	
15	15	|	L	P	P	P	P	

16	16			G	G	G	G	G	
17	17			D	E	E	E	E	
18	18			Q	P	P	P	P	
19	19			A	A	A	A	A	
20	20			S	S	S	S	S	
21	21			I	I	I	I	I	
22	22			S	S	S	S	S	
23	23	FR1		C	C	C	C	C	
24	24	CDR1		R	R	R	R	R	
25	25			S*	S*	S*	S*	S*	Cano L1 4(16)
26	26			S	S	S	S	S	
27	27			Q	Q	Q	Q	O	
27A	28			S	S	S	S	S	
27B	29			I*	L*	L*	i*	I*	Cano L1 4(16)
27C	30			V	L	L	i	I	
27D	31			H	H	H	H	H	
27E	32			S	S	S	S	S	
28	33			N	N	N	N	N	
29	34			G	G	G	G	G	
30	35			N	Y	Y	n	N	
31	36			T	N	N	t	T	
32	37			Y	Y	Y	Y	Y	
33	38			L*	L*	L*	L*	L*	Cano L1 4(16)
34	39	CDR1		Q	D	D	q	Q	
35	40	FR2		W	W	W	W	W	zona Vernier
36	41			Y	Y	Y	Y	Y	VH/VL inter zona Vernier
37	42			L	L	L	L	L	
38	43			Q	Q	Q	Q	Q	VIWH inter
39	44			K	K	K	K	K	
40	45			P	P	P	P	P	
41	46			G	G	G	G	G	
42	47			Q	Q	Q	Q	Q	
43	48			S	S	S	S	S	
44	49			P	P	P	P	P	VIWH inter (+)
45	50			K	Q	Q	Q	Q	
46	51			L	L	L	L	L	VL/VH inter zona Vernier
47	52			L	L	L	L	L	zona Vernier
48	53			I	I	I	I*	I*	Cano L2 I(7) zona Vernier
49	54	FR2		Y	Y	Y	Y	Y	zona Vernier
50	55	CDR2		K	L	L	k	K	

51	56	|	V*	G*	G*	v*	v*	Cano L2 l(7)
52	57	|	S*	S*	S*	S*	S*	Cano L2 l(7)
53	58		N	N	N	N	N	
54	59		R	R	R	R	R	
55	60		L	A	A	I	L	
56	61	CDR2	Y	S	S	y	Y	
57	62	FR3	G	G	G	G	G	
58	63		V	V	V	V	V	
59	64		P	P	P	P	P	
60	65		D	D	D	D	D	
61	66		R	R	R	R	R	
62	67		F	F	F	F	F	
63	68		S	S	S	S	S	
64	69	|	G*	G*	G*	G*	G*	Cano L2 l(7) zona Vernier
65	70		S	S	S	S	S	
66	71	|	G	G	G	G	G	zona Vernier
67	72		S	S	S	S	S	
68	73	|	G	G	G	G	G	zona Vernier
69	74	|	T	T	T	T	T	zona Vernier
70	75		D	D	D	D	D	
71	76	|	F*	F*	F*	F*	F*	Cano L1 4(16) zona Vernier
72	77		T	T	T	T	T	
73	78		L	L	L	L	L	
74	79		K	K	K	K	K	
75	80		I	I	I	I	I	
76	81		S	S	S	S	S	
77	82		S	R	R	R	R	
78	83		V	V	V	V	V	
79	84		E	E	E	E	E	
80	85		A	A	A	A	A	
81	86		E	E	E	E	E	
82	87		D	D	D	D	D	
83	88		L	V	V	V	V	
84	89		G	G	G	G	G	
85	90		V	V	V	V	V	
86	91		Y	Y	Y	Y	Y	
87	92		Y	Y	Y	Y	Y	VL/VH inter
88	93	FR3	C	C	C	C	C	
89	94	CDR3	F	M	M	f	F	VL/VH inter
90	95	|	Q*	Q*	Q*	Q*	Q*	Cano L3 l(9)
91	96		G	A	A	g	G	VL/VH inter
92	97		S	L	L	s	S	
93	98		H	Q	Q	h	H	

94	99		V	T	T	V	V	
95	100	|	P*	P*	P*	P*	P*	Cano L3 I(9)
96	101	|	W		Q	w	W	VL/VH inter (+)
97	102	CDR3	T		T	T	T	
98	103	FR4	F		F	F	F	VL/VH inter (+) zona Vernier
99	104		G		G	G	G	
100	105		G		Q	Q	Q	
101	106		G		G	G	G	
102	107		T		T	T	T	
103	108		K		K	K	K	
104	109		L		V	V	V	
105	110		E		E	E	E	
106	111		I		I	I	I	
107	112	FR4	K		K	K	K	

Leyenda: La primera columna (Kabat) indica la posición del residuo de aminoácidos de acuerdo con Kabat et al. (1991); la segunda columna (#) indica la posición del residuo de aminoácidos en la secuencia regular; la tercera columna (FR o CDR) se conformó con el fin de identificar fácilmente los segmentos del esqueleto (FR1, FR2, FR3 y FR4) y los segmentos CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) ("CDR" equivale a "Región Determinante de Complementaridad") con las tres CDRs que separan las cuatro FRs; la cuarta columna (7C10 de cadena ligera de ratón) representa la secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 54) de la región VL del anticuerpo 7C10 de ratón; la quinta columna (estirpe germinal humana DPK15/A19) representa la secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 59) de la cadena ligera V humana kappa II de la estirpe germinal; la sexta columna (GM607) representa la secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 58) de la región V_L del anticuerpo humano GM607; la séptima y octava columnas (7C10 1 y 2) representan las secuencias de aminoácidos del anticuerpo humanizado 1 y 2 7C10 VL (respectivamente SEQ ID No. 61 y 65). "*" indica las partes de la estructura canónica del lazo CDR tal como se define por Chothia et al. (Nature, 342, 877-883, 1989).

Ejemplo 13: Proceso de humanización por injerto CDR de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo 7C10 (7C10 VH)

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

Como paso preliminar a la humanización por injerto CDR, la secuencia de aminoácidos de 7C10 VH se comparó primeramente con todas las secuencias VH de ratón presentes en la base de datos de Kabat (dirección en Internet: ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/database/kabat/fasta_format/, última actualización de los datos de 1999). Se ha identificado así 7C10 VH como perteneciente al subgrupo I (A) de las cadenas pesadas, como se define por Kabat et al. (1991). Las regiones VH de anticuerpos monoclonales de ratón con una identidad de secuencia, que va hasta el 90.5%, se han identificado (AN03'CL (SEQ ID No. 70), ver Figura 22). Con el fin de tratar de identificar los residuos extraordinarios en la secuencia 7C10 VH, alineamos la secuencia de aminoácidos de 7C10 VH (SEQ ID No. 69) con la secuencia de consenso (SEQ ID No. 71) del subgrupo I (A) de las cadenas pesadas como se define por Kabat (ver Figura 22).

Residuo 17 (numeración de Kabat), Thr para la secuencia de consenso del subgrupo I(A) y Ser en 7C10 VH, se localiza en la superficie de la molécula con respecto a la interface con la región constante. Este residuo no parece ser importante.

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

Residuo 84 (numeración de Kabat), Thr para la secuencia de consenso del subgrupo I(A) y Asn en 7C10 VH. Asn se encontró 93 veces en VH de ratón y 3 veces en VH humanas. De acuerdo con el peso molecular, es un residuo de superficie remoto del paratopo.

La numeración de los aminoácidos es la de Kabat et al. (1991). Los residuos en las regiones marco (aparte de CDRs), que difieren entre 7C10

VH y el subgrupo I(A) de ratón de Kabat están subrayadas. AN03'CL representa la secuencia de la cadena pesada de un anticuerpo de ratón (el número de acceso en la base de datos de Kabat es P001289).

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

Con el fin de identificar el mejor candidato humano para el "injerto CDR", se buscó la región VH de origen humano que tiene la homología más grande posible con 7C10 VH. A este fin, la secuencia de aminoácidos 7C10 VH se comparó con todas las secuencias VH humanas presentes en la base de datos de Kabat. 7C10 VH de ratón tuvo la mayor homología de secuencia con las regiones VH humanas del subgrupo II, como se define por Kabat et al. (1991). Se identificaron regiones VH de anticuerpos monoclonales de origen humano, que tenían una identidad de secuencia que va hasta 67.3% (VH FUR1'CL humana (SEQ ID No. 73, ver Figura 23) sobre la totalidad de los 98 aminoácidos codificados por el gen variable (es decir, aparte de CDR3 y la región J). Una estirpe germinal de origen humano, 4.22 VH IV (Sanz et al., 1989), que tiene una identidad de secuencia 68.4%, de acuerdo con los mismos criterios que para VH FUR1'CL, se identificó igualmente (estirpe germinal (SEQ ID No. 74), ver Figura 23). La secuencia codificada por la estirpe germinal 4.22 VH IV se escogió como secuencia humana receptora de las CDRs (de acuerdo con la definición de Kabat) de 7C10 VH de ratón en lugar de VH FUR1'CL porque, al comparar las secuencias de 4.22 VH IV y VH FUR1'CL con la de la secuencia de consenso del subgrupo humano II (subgrupo II humano de Kabat (SEQ ID No. 72), ver Figura 23 y tabla 7), no pudo identificarse un residuo atípico en las regiones marco (Rch) para 4.22 VH IV, aunque se identificó la presencia de dos residuos atípicos (Gln y Arg en las posiciones 81 y 82A de acuerdo con la nomenclatura de Kabat, respectivamente) en la secuencia codificada por VHFUR1'CL.

c) Versiones humanizadas de 7C10 VH

La siguiente etapa en el proceso de humanización consistió en juntar las CDRs de 7C10 VH de ratón a las regiones marco (Rch) de la estirpe

369
369

germinal humana 4.22 VH IV (Sanz et al., 1989). En esta etapa del proceso, el proceso molecular de las regiones Fv de ratón de 7C10 es particularmente útil en la elección de los residuos de ratón a conservarse como capaces de jugar un papel en el mantenimiento de la estructura tridimensional de la molécula (estructura canónica de las CDRs, interface VH/VL, etc.) o en la fijación al antígeno (perteneciente al paratopo). En las Rchs, cada diferencia entre los aminoácidos (7C10 VH) de ratón y (4.22 VH IV) humanos se examinó escrupulosamente (ver Tabla 7). Adicionalmente, se tomaron en cuenta, si fuera necesario, los residuos particulares en la secuencia 7C10 VH de ratón, que se había identificado (ver Ejemplo 8.a).

En la primera versión de 7C10 VH humanizado por "injerto CDR", humanizado 1, se llevaron a cabo cambios en las regiones marco (Rch) de 4.22 VH IV (ver Tabla 7, figura 24 para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 75) y Figura 25 para la secuencia de ADN (SEQ ID No. 76 y 78) y la secuencia de aminoácidos que comprende la señal de péptidos (SEQ ID No. 77)). Los cuatro cambios conciernen a:

Residuo 30 (nomenclatura de Kabat) situado en Rch 1. Este residuo entra en efecto en la composición estructural de la CDR1 de 7C10 VH (como se define por Chothia et al., 1989) y podría, por lo tanto, ser crítico para mantener este lazo en su conformación correcta. Por consiguiente, la Thr presente en esta posición en la secuencia de ratón 7C10 VH se conserva en esta misma posición en la forma humanizada.

Residuo 48 (nomenclatura de Kabat) situado en Rch 2. Este residuo está cercano a las CDRs, aunque de acuerdo con el modelo no en contacto directo con las últimas, y podría influenciar su conformación definitiva. La metionina presente en esta posición en la secuencia 7C10 VH de ratón se conserva por lo tanto en la misma posición en la forma humanizada 1.

Residuo 67 (nomenclatura de Kabat) situado en Rch 3. El residuo está cercano a las CDRs y, de acuerdo con el modelo molecular,

podría contactar lisina 60 (nomenclatura de Kabat) en la CDR 2. La isoleucina presente en esta posición en la secuencia 7C10 VH de ratón se conserva, por lo tanto, es esta posición en la forma humanizada 1.

Residuo 71 (nomenclatura de Kabat) situado en Rch 3. Este residuo es parte de la estructura canónica de la CDR 2 y debe, en consecuencia, ser crítico para mantener este lazo en su conformación correcta. Por lo tanto, la arginina presente en esta posición en la secuencia de ratón 7C10 VH se conserva en esta posición en la forma humanizada 1.

En la segunda versión de 7C10 VH humanizado por "injerto CDR", humanizada 2, se llevaron a cabo dos cambios en las regiones marco (Rch) de 4.22 VH IV. Estos dos cambios conciernen a los residuos 30 y 71 (nomenclatura de Kabat), ya descritos en la forma humanizada 1 (ver Tabla 7, Figura 24 para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 79) y Figura 26 para la secuencia de ADN (SEQ ID No. 80 y 82) y la secuencia de aminoácidos que comprende la señal de péptidos (SEQ ID No.81)).

En la tercera forma de 7C10 VH humanizada por "injerto CDR", humanizada 3, no se llevó a cabo ningún cambio en las regiones marco (Rch) de 4.22 VH IV. Por lo tanto, todos los residuos de las Rchs son de origen humano incluidos los 30, 48, 67 y 71 (nomenclatura de Kabat) que se han conservado (ver Tabla 7, Figura 24 para la secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 83) y Figura 27 para la secuencia de ADN (SEQ ID No. 84 y 86) y la secuencia de aminoácidos que comprende la señal de péptidos (SEQ ID No. 85)). Esta forma humanizada 3 es por consiguiente totalmente humanizada (aparte, lógicamente, de las CDRs en sí mismas como se define por Kabat), puesto que todos los residuos de las Rchs son aquellos codificados por el gen VH de la estirpe germinal 4.22 VH IV.

TABLA 7: Alineación de las secuencias de aminoácidos que llevan al diseño de las regi nes 7C10 V_H humanas remodeladas

Kabat	FR o CDR	Cadena pesada 7C10 de ratón	Estirpe Germinal 4.22 VH IV	FUR1' CL VH humano	7C10 H humano 1 remodelado	7C10 H humano 2 remodelado	7C10 H humano 3 remodelado	Commentarios
1	FR1	D	Q	Q	Q	Q	Q	
2		V	V	V	V	V	V	Zona Vernier
3		Q	Q	Q	Q	Q	Q	
4		L	L	L	L	L	L	
5		Q	Q	Q	Q	Q	Q	
6		E	E	E	E	E	E	
7		S	S	S	S	S	S	
8		G	G	G	G	G	G	
9		P	P	P	P	P	P	
10		G	G	G	G	G	G	
11		L	L	L	L	L	L	
12		V	V	V	V	V	V	
13		K	K	K	K	K	K	
14		P	P	P	P	P	P	
15		S	S	S	S	S	S	
16		Q	E	E	E	E	E	
17		S	T	T	T	T	T	
18		L	L	L	L	L	L	
19		S	S	S	S	S	S	
20		L	L	L	L	L	L	
21		T	T	T	T	T	T	
22		C	C	C	C	C	C	
23		S	T	T	T	T	T	
24		V	V	V	V*	V*	V*	H1 2(6) canónico

WO 2005/056607

PCT/IB2004/004360

25	|	T	S	S	S	S	S	
26	|	G*	G*	G*	G*	G*	G*	H1 2(6) canónico
27	|	Y*	Y*	Y*	Y*	Y*	Y*	H1 2(6) canónico Zona Vernier
28	|	S	S	S	S	S	S	Zona Vernier
29	|	I*	I*	I*	I*	I*	I*	H1 2(6) canónico Zona Vernier
30	FR1	T	S	S	t	T	S	Zona Vernier próxima a CDRs
31	CDR1	G	S	S	g	G	g	
32	|	G	G	G	G	G	G	
33	|	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
34	|	L	Y	Y	l	L	l	
35	|	W*	W*	W*	W*	W*	W*	H1 2(6) canónico Interface VH/VL
35A	CDR1	N	G	G	n	N	n	
36	FR2	W	W	W	W	W	W	
37	|	I	I	I	I	I	I	Interface VH/VL
38	|	R	R	R	R	R	R	
39	|	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Interface VH/VL
40	|	P	P	P	P	P	P	
41	|	P	P	P	P	P	P	
42	|	G	G	G	G	G	G	
43	|	K	K	K	K	K	K	
44	|	K	G	G	G	G	G	
45	|	L	L	L	L	L	L	Interface VH/VL (+)
46	|	E	E	E	E	E	E	
47	|	W	W	W	W	W	W	Interface VH/VL Zona Vernier
48	|	M	I	I	m	I	I	Zona Vernier próxima a CDRs
49	FR2	G	G	G	G	G	G	Zona Vernier

50	CDR2	Y	S	S	y	Y	y	Zona Vernier
51	|	I	I	M	I	I	I	
52	|	S	Y	F	s	S	s	
53	|	Y	H	H	y	Y	y	
54	|	D	S	S	d	D	d	
55	|	G*	G*	G*	G*	G*	G*	H2 1(16) canónico
56	|	T	S	S	t	T	t	
57	|	N	T	S	n	N	n	
58	|	N	Y	Y	n	N	n	
59	|	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
60	|	K	N	N	k	K	k	
61	|	P	P	P	P	P	P	
62	|	S	S	S	S	S	S	
63	|	L	L	L	L	L	L	
64	|	K	K	K	K	K	K	
65	CDR2	D	S	S	d	d	d	
66	FR3	R	R	R	R	R	R	
67	|	I	V	V	i	V	V	Zona Vernier próxima a CDRs
68	|	S	T	T	T	T	T	
69	|	I	I	I	I	I	I	Zona Vernier
70	|	T	S	S	S	S	S	
71	|	R*	V*	V*	r*	r*	V*	H2 1(16) canónico Zona Vernier
72	|	D	D	D	D	D	D	
73	|	T	T	T	T	T	T	Zona Vernier
74	|	S	S	S	S	S	S	
75	|	K	K	K	K	K	K	
76	|	N	N	N	N	N	N	
77	|	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
78	|	F	F	F	F	F	F	Zona Vernier
79	|	F	S	S	S	S	S	
80	|	L	L	L	L	L	L	

81	|	K	K	Q	K	K	K	
82	|	L	L	L	L	L	L	
82A	|	N	S	R	S	S	S	
82B	|	S	S	S	S	S	S	
82C	|	V	V	V	V	V	V	
83	|	T	T	T	T	T	T	
84	|	N	A	A	A	A	A	
85	|	E	A	A	A	A	A	
86	|	D	D	D	D	D	D	
87	|	T	T	T	T	T	T	
88	|	A	A	A	A	A	A	
89	|	T	V	V	V	V	V	
90	|	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
91	|	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Interface VH/VL
92	|	C	C	C	C	C	C	
93	|	A	A	A	A	A	A	Interface VH/VL Zona Vernier
94	FR3	R*	R*	R*	R*	R*	R*	H1 2(6) canónico Zona Vernier
95	CDR3	Y		G	y	y	y	Interface VH/VL
96	|	G		R	g	g	g	
97	|	R		Y	r	r	r	
98	|	V		C	v	v	v	
99	|	F		S	f	f	f	
100	|			S				
100A	|			T				
100B	|			S				
100C	|			C				
100D	|			N				
100 E	|			W				
100K	|	F		F	f	f	f	Interface VH/VL (+)
101	|	D		D	d	d	d	
102	CDR3	Y		P	y	y	y	

103	FR4	W		W	W	W	W	Interface VH/VL (+) Zona Vernier
104		G		G	G	G	G	
105		Q		Q	Q	Q	Q	
106		G		G	G	G	G	
107		T		T	T	T	T	
108		T		L	L	L	L	
109		L		V	V	V	V	
110		T		T	T	T	T	
111		V		V	V	V	V	
112		S		S	S	S	S	
113	FR4	S		S	S	S	S	

Leyenda: La primera columna (Kabat) indica la posición del residuo de aminoácidos de acuerdo con Kabat et al. (1991); la segunda columna (FR o CDR) se conformó con el fin de identificar fácilmente los segmentos del esqueleto (FR1, FR2, FR3 y FR4) y los segmentos CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) con las tres CDRs que separan las cuatro FRs; la tercera columna (cadena pesada de ratón 7C10) representa la secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 69) de la región VH del anticuerpo de ratón 7C10; la cuarta columna (estirpe germinal 4.22 VH IV) representa la secuencia de aminoácidos del gen 4.22 VH IV (Sanz et al., 1989) (SEQ ID No. 74); la quinta columna (FUR1'CL VH humana, número de acceso de Kabat N020619) representa la secuencia de aminoácidos humana (SEQ ID No. 73) [espacio vacío] IgMK antilamina B de origen humano (Mariette et al., 1993); las columnas sexta, séptima y octava (7C10 1, 2 y 3 humanos remodelados) representan las secuencias de aminoácidos de la región V_H de 7C10 humano remodelado, respectivamente para las versiones 1 (SEQ ID No. 75), 2 (SEQ ID No. 79) y 3 (SEQ ID No. 83). "*" indica las partes de la estructura canónica del lazo CDR como se define por Chothia et al. (1989).

Ejemplo 14: Construcción de los genes que codifica para las versiones humanizadas de 1 de 7C10 VL y VH por ensamble de oligonucleótidos

a) Principio

Los genes (péptido líder + regiones variables VDJ para VH o VJ para VK) que codifican para las regiones variables humanizadas se sintetizaron por ensamble de fase sólida en microesferas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Los genes que codifican para 7C10 VH humanizado (445 pares de bases) y 7C10 VL humanizado (433 pares de bases) se construyen fusionando dos fragmentos de ADN debidos a la presencia de un sitio de restricción KpnI presente en las dos secuencias y situado casi a mitad de camino a lo largo del gen (a 200 y 245 nucleótidos con respecto al extremo 5' del gen para VL y VH, respectivamente). Los dos fragmentos que se fusionan entre sí se ensamblan mediante una técnica de ensamble que

consiste en usar oligonucleótidos fosforilados (aproximadamente 30-35 meros) hibridados dos a dos (un oligo sentido y el otro antisentido, con una homología de aproximadamente 50%) de tal modo que se sobrepongan durante el alargamiento. Un primer oligonucleótido biotinilado en la posición 5' se une a las microesferas magnéticas, y luego los pares de oligonucleótidos fosforilados se agregan uno por uno. El ligamiento fosfodiéster entre los oligonucleótidos fosforilados juxtapuestos se produce por la enzima T4 ADN ligasa.

Los genes así sintetizados *de novo* pueden clonarse directamente (por digestión con enzimas de restricción compatibles con el vector de expresión seleccionado) o amplificarse por PCR con el fin de obtener más material como preludio a la clonación direccional por digestión enzimática. La secuencia del gen así construida por ensamble *de novo* se verifica entonces mediante secuenciación automática del ADN.

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

Oligonucleótidos fosforilados en la posición 5' o biotinilados en la posición 5', cuya concentración se ajustó a 100 μM, se ordenaron de MWG Biotech (ver las secuencias de los oligonucleótidos usadas en Tabla 7 para la construcción de 7C10 VL humanizado, y Tabla 9 para la construcción de 7C10 VH humanizado). Los oligonucleótidos se hibridaron en pares (una mezcla equimolar, 500 pmol, de un oligo sentido y de un oligo antisentido en el tampón T4 ADN ligasa se calienta a 95°C durante 5 minutos y luego se deja enfriar en la mesa a temperatura ambiente) de acuerdo con el esquema descrito en Tabla 10.

El primer oligonucleótido biotinilado se fija a microesferas magnéticas recubiertas con estreptavidina (estreptavidina Dynabeads M-280, producto Dynal No. 112-05). Para esto, 500 pmol del oligonucléotido biotinilado en una solución 15 mM NaCl se agregan a 50 μl la microesferas decantadas (uso de un soporte magnético) previamente lavadas dos veces con 100 μl de tampón TE 1X (tampón Tris-EDTA 100X: 1 M Tris-HCl, pH 8, 0.1 M EDTA, Sigma T-9285). Luego de la incubación a 37°C durante 15 minutos, las microesferas se lavaron dos veces con el tampón de lavado (10

mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM EDTA y 50 mM NaCl) y los pares de oligonucleótidos hibridados se agregan entonces uno por uno. A cada re-adición de un par de oligonucleótidos, la mezcla se calienta a 95°C durante 5 minutos y luego se dejó enfriar en la mesa a temperatura ambiente. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, se agregan 2 μl de 10 U/μl T4 ADN ligasa (Biolabs), y la mezcla se incuba durante 20 minutos a 37°C. Las microesferas se lavan entonces (tampón de lavado) y, a continuación, se agregan los siguientes pares de oligonucleótidos sucesivamente

El último oligo no pareado (antisentido) se ensambla en la siguiente forma. 5 μl de oligo (500 pmol) y 43 μl de tampón de T4 ADN ligasa se agregan a las microesferas decantadas, en seguida se calienta la mezcla a 95°C durante 5 minutos y se deja enfriar en la mesa a temperatura ambiente. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, se agregan 2 μl de T4 ADN ligasa, y la mezcla se incuba a 37°C durante 20 minutos. Las microesferas se lavan entonces dos veces con tampón de lavado y luego dos veces con tampón TE 1X.

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

TABLA 8: Secuencia de ADN de oligonucleótidos usados para la construcción de 7C10 VL 1 humanizado por ensamble *de novo*

LeaderMluI.biotin	5'-GTCAGAACGCGTGCCGCC	(SEQ ID No. 87)
7C10Lresh.1sens	5'-ACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT	(SEQ ID No. 88)
7C10Lresh.2sens	5'-GATGTTCTGGTTTCCTGCTTCCAGCAGTGATG	(SEQ ID No. 89)
7C10Lresh.3sens	5'-TTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCC	(SEQ ID No. 90)
7C10Lresh.4sens	5'-GTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTG	(SEQ ID No. 91)
7C10Lresh.5sens	5'-CAGGTCTAGTCAGACCATTATACATAGTAATG	(SEQ ID No. 92)
7C10Lresh.6sens	5'-GAAACACCTATTTGGAATGGTACCTGCAGA	(SEQ ID No. 93)
7C10Lresh.7anti	5'-GGCAACTTCATGGTGGCGGCACGCGTTCTGAC	(SEQ ID No. 94)
7C10Lresh.8anti	5'-GAAACCAGAACATCAGCACCAACAGCCTAACA	(SEQ ID No. 95)
7C10Lresh.9anti	5'-CTGAGTCATCACAACATCACTGCTGGAAGCAG	(SEQ ID No. 96)
7C10Lresh.10anti	5'-TCTCCAGGGGTGACGGGCAGGGAGAGTGGAGA	(SEQ ID No. 97)
7C10Lresh.11anti	5'-TCTGACTAGACCTGCAGGAGATGGAGGCCGGC	(SEQ ID No. 98)
7C10Lresh.12anti	5'-AAATAGGTGTTTCCATTACTATGTACAATGC	(SEQ ID No. 99)
7C10Lresh.13sens	5'-CAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATAAA	(SEQ ID No. 100)
7C10Lresh.14sens	5'-GTTTCTAATCGGCTTTATGGGGTCCCTGACAG	(SEQ ID No. 101)
7C10Lresh.15sens	5'-GTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTA	(SEQ ID No. 102)
7C10Lresh.16sens	5'-CACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGAT	(SEQ ID No. 103)
7C10Lresh.17sens	5'-GTTGGGGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTCACA	(SEQ ID No. 104)
7C10Lresh.18sens	5'-TGTTCCGTGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGG	(SEQ ID No. 105)
7C10Lresh.19sens	5'-TGGAAATCAAACGTGAGTGGATCCTCTGCG	(SEQ ID No. 106)
7C10Lresh.KpnIREV	5'-TCTGCAGGTACCATTGC	(SEQ ID No. 107)
7C10Lresh.KpnIbiotin	5'-TGCAATGGTACCTGCAGAAGC	(SEQ ID No. 108)
7C10Lresh.20anti	5'-AGACTGCCCTGGCTTCTGCAGGTACCATTGCA	(SEQ ID No. 109)
7C10Lresh.21anti	5'-CGATTAGAAACTTTATAGATCAGGAGCTGTGG	(SEQ ID No. 110)
7C10Lresh.22anti	5'-TGCCACTGAACCTGTCAGGGACCCCATAAAGC	(SEQ ID No. 111)
7C10Lresh.23anti	5'-GATTTTCAGTGTAAAATCTGTGCCTGATCCAC	(SEQ ID No. 112)
7C10Lresh.24anti	5'-TAAACCCCAACATCCTCAGCCTCCACTCTGCT	(SEQ ID No. 113)
7C10Lresh.25anti	5'-TCCACGGAACATGTGAACCTTGAAAGCAGTAA	(SEQ ID No. 114)
7C10Lresh.26anti	5'-TTTGATTTCCACCTTGGTCCCTTGGCCGAAC	(SEQ ID No. 115)
7C10Lresh.BamHIantisens	5'-CGCAGAGGATCCACTCACG	(SEQ ID No. 116)

TABLA 9: Secuencia de ADN de oligonucleótidos usados para la construcción de 7C10 VH 1 humanizado por ensamble *de novo*

LeaderMluI.biotin	5'-GTCAGAACGCGTGCCGCC	(SEQ ID No. 117)
7C10Hresh.1sens	5'-ACCATGAAAGTGTTGAGTCTGTTGTACCTCTTGA	(SEQ ID No. 118)
7C10Hresh.2sens	5'-CAGCCATTCCTGGTATCCTGTCTCAGGTGCAGCT	(SEQ ID No. 119)
7C10Hresh.3sens	5'-TCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG	(SEQ ID No. 120)
7C10Hresh.4sens	5'-GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGT	(SEQ ID No. 121)
7C10Hresh.5sens	5'-TACTCCATCACCGGTGGTTATTTATGGAACTGG	(SEQ ID No. 122)
7C10Hresh.6sens	5'-ATACGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGG	(SEQ ID No. 123)
7C10Hresh.7sens	5'-ATGGGGTATATCAGCTACGACGGTACCAATAAC	(SEQ ID No. 124)
7C10Hresh.8antisens	5'-TCAACACTTTCATGGTGGCGGCACGCGTTCTGAC	(SEQ ID No. 125)
7C10Hresh.9antisens	5'-ATACCAGGAATGGCTGTCAAGAGGTACAACAGAC	(SEQ ID No. 126)
7C10Hresh.10antisens	5'-TGGGCCCGACTCCTGAAGCTGCACCTGAGACAGG	(SEQ ID No. 127)
7C10Hresh.11antisens	5'-TGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGCTTCACCAGTCC	(SEQ ID No. 128)
7C10Hresh.12antisens	5'-CCACCGGTGATGGAGTAACCAGAGACAGTGCAGG	(SEQ ID No. 129)
7C10Hresh.13antisens	5'-CCCTGGGGGCTGCCGTATCCAGTTCCATAAATAA	(SEQ ID No. 130)
7C10Hresh.14antisens	5'-TAGCTGATATACCCCATCCACTCCAGTCCCTT	(SEQ ID No. 131)
7C10Hresh.KpnIREV	5'-GTTATTGGTACCGTCG	(SEQ ID No. 132)
7C10Hresh.KpnIbiotin	5'-TACGACGGTACCAATAACTAC	(SEQ ID No. 133)
7C10Hresh.15sens	5'-AAACCCTCCCTCAAGGATCGAATCACCATATC	(SEQ ID No. 134)
7C10Hresh.16sens	5'-ACGTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA	(SEQ ID No. 135)
7C10Hresh.17sens	5'-AGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACTGCA	(SEQ ID No. 136)
7C10Hresh.18sens	5'-GTGTATTACTGTGCGAGATACGGTAGGGTCTT	(SEQ ID No. 137)
7C10Hresh.19sens	5'-CTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCA	(SEQ ID No. 138)
7C10Hresh.20sens	5'-CCGTCTCCTCAGGTGAGTGGATCCTCTGCG	(SEQ ID No. 139)
7C10Hresh.21antisens	5'-AGGGAGGGTTTGTAGTTATTGGTACCGTCGTA	(SEQ ID No. 140)
7C10Hresh.22antisens	5'-ACGTGTCACGTGATATGGTGATTCGATCCTTG	(SEQ ID No. 141)
7C10Hresh.23antisens	5'-AGAGCTCAGCTTCAGGGAGAACTGGTTCTTGG	(SEQ ID No. 142)
7C10Hresh.24antisens	5'-CAGTAATACACTGCAGTGTCCGCAGCGGTCAC	(SEQ ID No. 143)
7C10Hresh.25antisens	5'-AGTAGTCAAAGAAGACCCTACCGTATCTCGCA	(SEQ ID No. 144)
7C10Hresh.26antisens	5'-CTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCCCTGGCCCC	(SEQ ID No. 145)
7C10Hresh.BamHIantisens	5'-CGCAGAGGATCCACTCAC	(SEQ ID No. 146)

TABLA 10: Protocolo de apareamiento de oligonucleótidos para el ensamble *de novo* de genes que codifican para las formas humanizadas de 7C10 VH y VL

ensamble *de novo*	ensamble *de novo*
del fragmento MlUI-KpnI	del fragmento KpnI-BamHI
de 7C10 VL humanizado 1	de 7C10 VL humanizado 1
oligo líder biotinilado	oligo biotinilado 7C10 L
M1UI 7C10 VL	KpnI
Par oligo 1 y 7	Par oligo 13 y 20
Par oligo 2 y 8	Par oligo 14 y 21

Par oligo 3 y 9
Par oligo 4 y 10
Par oligo 5 y 11
Par oligo 6 y 12
Oligo antisentido 7C10 VL KpnI

Par oligo 15 y 22
Par oligo 16 y 23
Par oligo 17 y 24
Par oligo 18 y 25
Par oligo 19 y 26
Oligo antisentido 7C10 L BamHI

ensamble *de novo* del fragmento MIUI-KpnI de 7C10 VL humanizado 1

ensamble *de novo* del fragmento KpnI-BamHI de 7C10 VL humanizado 1

oligo líder biotinilado MIUI 7C10 VH
Par oligo 1 y 8
Par oligo 2 y 9
Par oligo 3 y 10
Par oligo 4 y 11
Par oligo 5 y 12
Par oligo 6 y 13
Par oligo 7 y 14
Oligo antisentido 7C10 VH KpnI

oligo biotinilado 7C10 H KpnI
Par oligo 15 y 21
Par oligo 16 y 22
Par oligo 17 y 23
Par oligo 18 y 24
Par oligo 19 y 25
Par oligo 20 y 26
Oligo antisentido 7C10 VH BamHI

Ejemplo 15: Construcción de los genes que codifican para las versiones humanizadas 2 de 7C10 VL y 7C10 VH y 3 y 7C10 VH por mutagénesis dirigida

La versión humanizada 2 de 7C10 VH se obtuvo por mutagénesis dirigida de los residuos 48 y 67 (de acuerdo con la nomenclatura de Kabat) de la versión 1. Esta mutagénesis dirigida se llevó a cabo con la ayuda del sistema QuikChange™ Site-directed mutagenesis de Stratagene (kit #200518) de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante. La

382
382

construcción se lleva a cabo en dos etapas, primero el residuo 48 en versión 1 se mutó con la ayuda del par de cebadores 7C10H humanizado 1 QCM48 sentido y antisentido (ver Tabla 11) y, más tarde, esta versión mutada en el residuo 48 se mudó ella misma en el residuo 67 con la ayuda del par de cebadores 7C10H humanizado 1 QCI67 sentido y antisentido (ver Tabla 11).

La versión humanizada 3 de 7C10 VH se obtuvo por mutación dirigida al sitio de los residuos 30 y 71 (de acuerdo con la nomenclatura de Kabat) de versión 2 usando igualmente el sistema QuikChange™. Esta construcción se lleva a cabo en dos etapas. En primer lugar, el residuo 30 en versión 2 se mudó con la ayuda de los cebadores 7C10H humanizado QCT30 sentido y antisentido (ver Tabla 11). Posteriormente, esta versión mutada en el residuo 30 se mutó ella misma en el residuo 71 usando el par de cebadores 7C10H humanizado 1V67QCR71 sentido y antisentido (ver Tabla 11).

La versión humanizado de 2 de 7C10 VL se obtuvo por mutación dirigida al sitio del residuo 2 (de acuerdo con la nomenclatura de Kabat) de versión 1 usando el sistema QuikChange™. El residuo 2 en versión 1 se mutó usando el par de cebadores 7C10L humanizado 1 QCV2 sentido y antisentido (ver Tabla 11).

TABLA 11: Listado de los oligonucleótidos usados para la mutagénesis dirigida por el sistema QuikChange™ de Stratagene

7C10Hhumanis61QCT30. sens	5'-CTGGTTACTCCATCAGCGGTGGTTATTTATG	(SEQ ID No. 147)
7C10Hhumanis61QCT30. antisens	5'-CATAAATAACCACCGCTGATGGAGTAACCAG	(SEQ ID No. 148)
7C10Hhumanis61QCM48. sens	5'-GGGACTGGAGTGGATCGGGTATATCAGCTAC	(SEQ ID No. 149)
7C10Hhumanis61QCM48. antisens	5'-GTAGCTGATATACCCGATCCACTCCAGTCCC	(SEQ ID No. 150)
7C10Hhumanis61QCI67. sens	5'-TCCCTCAAGGATCGAGTCACCATATCACGTG	(SEQ ID No. 151)
7C10Hhumanis61QCI67. antisens	5'-CACGTGATATGGTGACTCGATCCTTGAGGGA	(SEQ ID No. 152)
7C10Hhumanis61V67QCR71. sens	5' -GATCGAGTCACCATATCAGTGGACACGTCCAAGAA CCAG	(SEQ ID No. 153)
7C10Hhumanis61V67QCR71. antisens	5' -CTGGTTCTTGGACGTGTCCACTGATATGGTGACTC GATC	(SEQ ID No. 154)
7C10Lhumanis61QCV2. sens	5'-GCTTCCAGCAGTGATATTGTGATGACTCAGT	(SEQ ID No. 155)
7C10Lhumanis61QCV2. antisens	5'-ACTGAGTCATCACAATATCACTGCTGGAAGC	(SEQ ID No. 156)

Ejemplo 16: Transfección de las células cos7 por electroporación

Los vectores de expresión mamíferos que contenían las versiones quiméricas o humanizadas de las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo 7C10 en ensayaron en células cos7 para la expresión transitoria de los anticuerpos recombinantes 7C10. El ADN se introdujo en las células cos por electroporación con la ayuda de un instrumento BioRad (Gene Pulsar). El ADN (10 μg de cada vector) se agrega a alícuotas de 0.8 ml de células cos en una concentración de $1x10^7$ células por ml en tampón PBS (sin Ca++ y Mg++). Se aplicó una pulsación de 1900 voltios y una capacidad de 25 μF. Las células cos transfectadas se agregan entonces a 8 ml de medio DMEM que contenía 5% de suero bovino y se incuban a 37°C durante 72 horas. A continuación se recoge el sobrenadante, se centrifuga con el fin de eliminar los desechos de células y se ensaya mediante ELISA para medir su concentración de anticuerpo recombinante 7C10 de tipo IgG1/humano Kappa.

384
384

Ejemplo 17: Método ELISA para medir las concentraciones de anticuerpo recombinante IgG1/humano Kappa presente en el sobrenadante de los transfectantes cos

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

Ejemplo 18: Método ELISA para determinar la actividad de reconocimiento de los anticuerpos recombinantes 7C10 de tipo IgG1/Kappa humana en el receptor para IGF1 (IGF-IR)

Los sobrenadantes de cultivo cos7 se probaron en cuanto a su capacidad de reconocer IGF-IR por un método ELISA. Placas ELISA de 96 pocillos (Dynex Immulon 2HB) se recubrieron con 100 μl por pocillo de una solución PBS que contenía 0.31 ng/μl de IGF-IR (Human Insulin-Like Growth Factor I soluble Receptor, R & D Systems, #391-GR) mediante incubación durante una noche a 4°C. Luego de lavar con PBS que contenía 0.05% Tween 20, las placas se saturaron mediante la adición de una solución de PBS, que contenía 0.5% de solución de gelatina, e incubación a

385
385

37°C durante 1 hora. Luego de tres lavados con PBS, las muestras de sobrenadantes cos a ensayarse, diluidas previamente en serie en PBS que contenía 0.1% de gelatina y 0.05% Tween 20, se agregaron a las placas. Luego de la incubación a 37°C durante 1 hora seguida por tres lavados (PBS que contenía 0.05% Tween 20), un anticuerpo IgG anti-humano (específico para el fragmento Fc) conjugado con peroxidasa (HRP, JacksonImmune-Research Laboratories Inc., #109-035-098) se agregó (dilución a 1/5000 en PBS que contenía 0.1% de gelatina y 0.05% Tween 20). Luego de la incubación durante 45 minutos a 37°C y 3 lavados (PBS que contenía 0.05% Tween 20), se agregó el sustrato TMB (KPL #50-76-04). Luego de la incubación durante 10 minutos, se detuvo la reacción mediante la adición de 1 M de ácido sulfúrico, y se leyó la densidad óptica a 450 nm.

Ejemplo 19: Determinación de la actividad de reconocimiento de IGF1-R por diferentes versiones del anticuerpo 7C10 humanizado por "injerto CDR"

En primer lugar, comparamos la actividad de reconocimiento de las formas humanizadas 1 de las cadenas ligeras y pesadas de 7C10 para el IGF-IR con respecto a la forma quimérica. Figura 28 muestra los resultados de un ensayo ELISA de reconocimiento del IGF-IR (ver Ejemplo 18) de sobrenadantes de células cos7, cuya concentración de IgG1/Kappa humana se había determinado previamente mediante ELISA (ver Ejemplo 17). Las curvas de análisis volumétrico (***"titration curves"***) de los cuatro anticuerpos recombinantes probados se superponen, indicando perfectamente que sus afinidades relativas para IGF-IR son muy similares. Por lo tanto, se concluye de esto que la forma humanizada 1 de 7C10, compuesta por la cadena ligera 1 humanizada 1 (1 solo residuo de ratón presente en las regiones marco) en combinación con la cadena pesada humanizada 1 (4 residuos de ratón presentes en las regiones marco), específicamente reconoce el IGF-IR y posee una afinidad muy similar a la del anticuerpo quimérico (regiones variables de ratón).

386
386

Posteriormente, consideramos la influencia del residuo 2 (de acuerdo con la nomenclatura de Kabat) de la cadena ligera humanizada de 7C10 (versión 1 humanizada versus humanizada 2, ver Figura 19) en el reconocimiento del IGF-IR. Figura 29 muestra los resultados del ensayo ELISA para el reconocimiento del IGF-IR (ver Ejemplo 18) de sobrenadantes de células cos7, cuya concentración de IgG1/Kappa humana se había determinado previamente mediante ELISA (ver Ejemplo 17). Las dos versiones humanizadas 1 y 2 de la cadena ligera se habían combinado sucesivamente con 7C10 VH 1 humanizado. Las curvas de análisis volumétrico de las dos combinaciones se superponen, indicando que la mutación del residuo 2 de la cadena ligera, que se había cambiado de una valina en la versión 1 humanizada en una isoleucina en la forma humanizada 2, aparentemente no tiene influencia en la afinidad relativa de reconocimiento del receptor IGF1. La forma humanizada 2 de la cadena ligera de 7C10 forma, por consiguiente, una versión donde no se ha conservado un residuo de ratón (aparte de las CDRs). Esta versión, totalmente humanizada, representa la versión preferida de 7C10 VL.

La versión totalmente humanizada de la cadena ligera 7C10 (versión humanizada 2, ver más arriba) se ensayó en combinación con las tres versiones humanizadas de la cadena pesada de 7C10. Figura 30 muestra los resultados del ensayo ELISA para el reconocimiento del IGF-IR de sobrenadantes de células cos7, cuya concentración de IgG1/Kappa humana se había determinado previamente mediante ELISA (ver Ejemplo 17). Las curvas de análisis volumétrico son muy similares y virtualmente se solapan con la curva de referencia que corresponde al anticuerpo quimérico, indicando que las tres versiones humanizadas 1, 2 y 3 de 7C10 VH arrojan una afinidad relativa idéntica para IGF-IR, cuando se combinan con 7C10 VL 2 humanizado. No obstante, otras pruebas ELISA conducidas en paralelo (no se indican los resultados) han revelado que una mutación puntual del residuo 71 (nomenclatura de Kabat) de una arginina (ratón) en una valina (humana) implicaba una pequeña pérdida de afinidad del anticuerpo correspondiente para IGF- IR. Por consiguiente, es razonable

pensar que 7C10 VH 2 humanizado tiene la misma afinidad relativa para IGF-IR que para 7C10 VH 1 humanizado. En consecuencia, esta forma humanizada 2 se preferirá con respecto a la forma 1, puesto que sólo tiene dos aminoácidos de ratón (residuos 30 y 71, ver Figura 24). Igualmente, se preferirá la forma humanizada 3, que no tiene ningún residuo de ratón (aparte de CDRs), puesto que sólo parece implicar una pérdida mínima de afinidad.

En conclusión, parece que dos formas humanizadas del anticuerpo 7C10 de acuerdo con la presente invención son particularmente preferidas. Una forma constituida por la combinación de 7C10 VH 2 humanizado (2 residuos de ratón conservados) con 7C10 VL 2 humanizado (residuo de ratón no conservado) y otra forma constituida por la combinación de 7C10 VH 3 humanizado (residuo de ratón no conservado) con 7C10 VL 2 humanizado (residuo de razón no conservado). Esta última forma constituye la última versión humanizada puesto que ningún residuo de ratón está presente al mismo tiempo en las cadenas ligeras y pesadas.

Ejemplo 20: Expresión de EGFR y IGF-IR en la superficie de células A549

La sinergia de acción, obtenida de la administración conjunta de dos MABs dirigidos respectivamente contra IGF-IR y EGFR, se estudió en ratones inmunitariamente desprotegidos, portadores de un tumor pulmonar amicrocítico establecido por inyección subcutánea (s.c.) de células A549 (estirpe celular de carcinoma de pulmón).

Ante todo, y con el fin de garantizar la presencia de los dos receptores IGF-IR y EGFR en la superficie de la célula A549 antes de inyectar ésta al ratón, se llevó a cabo la marcación para lectura FACS de estas células con, respectivamente, el MAB anti-IGF-IR 7C10 murino (Figura 37B) y el MAB anti-EGFR 225 murino (Figura 37D). Para hacerlo, se saturaron las células durante 30 minutos a 4°C con una solución de PBS 10% FCS (suero bovino fetal), se lavaron y luego se incubaron durante 30 minutos a 4°C con el

MAB de interés. Luego de 3 lavados nuevos, se agrega el anticuerpo anti-especie secundario acoplado a FITC (isotiocianato de fluoresceína). Luego de la incubación durante 30 minutos, se lleva a cabo la lectura en el FACS (Clasificador de Células Activadas por Fluorescencia) a 520 nm (excitación 488 nm).

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

Ejemplo 21: Sinergia de acción de un MAB anti-IGF-IR y un MAB anti-EGFR administrados conjuntamente *in vivo*, en el ratón inmunitariamente desprotegido en el contexto de un tratamiento antitumoral

Para este estudio, se seleccionaron ratones inmunitariamente desprotegidos injertados s.c. con 5.10^6 células A549. Cinco días después del injerto de las células, se midieron los tumores, y se forma un lote homogéneo de ratones en términos de volumen del tumor. A partir de este lote, se generan aleatoriamente grupos de 6 ratones. Estos ratones se tratarán intraperitonealmente (i.p.), dos veces por semana con cada uno de los MAB 7C10 y 225 individualmente con la dosis de 250 µg/ratón o con los dos MAB en administración conjunta. El MAB 9G4 se administra como isotipo control de experimento.

Los resultados presentados en Figura 38 muestran que cada uno de los anticuerpos 7C10 y 225 administrado solo es capaz de inducir una disminución significativa en el crecimiento del tumor *in vivo*. Puede anotarse que los dos MAB ensayados tienen una actividad comparable en el crecimiento del tumor A549. En una forma sorprendente con respecto a la

literatura, se observa una sinergia significativa durante la administración simultánea de los dos MAB ($p \leq 0.01$ en cada uno de los tiempos de la cinética en una prueba *t*) sugiriendo que existe una colaboración de los dos receptores para el crecimiento óptimo de un tumor *in vivo* y que, contrario a los datos en la literatura, el bloqueo de uno de los dos ejes no basta para inhibir totalmente el crecimiento mediado por el segundo.

Ejemplo 22: Estudio de actividad antitumoral de los anticuerpos murinos 7C10 y 225 administrados conjuntamente en ratones ortotópicamente implantados con células A549

El uso de modelos ortotópicos para la evaluación de la actividad antitumoral presentas un interés particular con respecto al proceso de la diseminación metastásica de un tumor. Con el fin de evaluar la actividad antitumoral de una mezcla de anticuerpo dirigido respectivamente contra IGF-IR y EGFR, 10^6 células A549 (cáncer pulmonar amicrocítico) se implantaron en la cavidad intrapleural de ratones inmunitariamente desprotegidos. Hay que anotar que la consecuencia de este tipo de implantación de tumor es una diseminación metastásica similar a la observada en el hombre y lleva a la muerte de los animales. Figura 39 muestra que la administración de los anticuerpos 225 y 7C10 solos permite una ganancia comparable y significativa en la supervivencia a observarse. En forma sorprendente, la administración conjunta de estos dos anticuerpos aumenta de manera considerable la supervivencia de los animales, sugiriendo que este tratamiento podría tener un impacto en la diseminación metastásica de las células tumorales.

Ejemplo 23: 7C10 y 7H2HM inhiben la fosforilación de la tirosina de la cadena de IGF-IR e IRS-1

Células MCF7 se cultivan durante 24 horas con una concentración de 5.10^4 células/cm^2 (placas de 75 cm^2, COSTAR) en 20 ml de RPMI sin rojo fenol, mezcladas con 5 mM de glutamina, penicilina/estreptomicina (respectivamente 100 U/100 μg/ml) y 10% de suero bovino fetal. Luego de

tres lavados en PBS, las células se incubaron durante 12 horas en medio (RPMI) sin rojo fenol, desprovisto de suero bovino fetal y se mezclaron con 5 mM de glutamina, penicilina/estreptomicina, albúmina sérica bovina a 0.5 µg/ml (Sigma A-8022) y transferrina a 5 µg/ml (Sigma T8158).

Para la activación, las células se incubaron primero a 37°C durante 2 minutos con anticuerpos bloqueadores (10 µg/ml), y luego se agregó IGF1 (Sigma I3769, 50 ng/ml) durante dos minutos más. La reacción se detuvo por aspiración del medio de incubación, y las placas se pusieron en hielo. Las células se solubilizaron por la adición de 0.5 ml de tampón de lisis (50 mM tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% de deoxicolato de sodio), mezcladas con inhibidores de proteasa (1 tableta por 50 ml, Boehringer Ref.: 1697 498), e inhibidores de fosfatasa (Calbiochem Ref.: 524625 (1/100)). Las células se rasparon, y la suspensión se recuperó y se puso en un agitador a 4°C durante 1.5 horas. Las soluciones se centrifugaron a 12.000 rpm durante diez minutos (4°C), y se cuantificaron por BCA las concentraciones de proteína de los sobrenadantes.

500 µg de proteínas de lisado de células se mezclaron con el anti-IGF-IR (Santa cruz Ref.: sc-713) para inmunoprecipitación y se incubaron en el agitador a 4°C durante 1.5 horas. Se recuperaron los inmunoprecipitados mediante la adición de proteína A-agarosa (Boehringer Ref.: 1 134 515) y se incubaron toda la noche en el agitador a 4°C. Para la inmunoprecipitación de IRS-1, se utilizaron anticuerpos anti-IRS-1 acoplados a microesferas de agarosa (Santa cruz Ref.: 559Ac). Las microesferas de agarosa se lavaron dos veces con 1 ml de tampón de lisis, dos veces con un tampón de lavado 1 (50 mM tris-HCl pH 7.5; 500 mM NaCl; 0.1% Nonidet P40; 0.05% deoxicolato de sodio (Boehringer 1 332 597), se mezclaron con inhibidores de proteasa e inhibidores de fosfatasa) y una vez con un tampón de lavado 2 (50 mM tris-HCl; 0.1% Nonidet P40; 0.05% deoxicolato de sodio (Boehringer Ref.: 1 332 597), se mezclaron con inhibidores de proteasa e inhibidores de fosfatasa 1/100). Los inmunoprecipitados se resuspendieron en tampón de Laemmli, calentado a 100°C durante 5 minutos. Los sobrenadantes se analizaron por electroforesis en gel SDS de poliacrilamida

(8% Novex EC6015). Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa seguidas por una inmunotransferencia con anticuerpos anti-fosfotirosina conjugados a HRP (upstate Biotechnology 4G10) o anti-cadena beta de IGF-IR o anti-IRS-1 (Santa Cruz Ref.: sc 8038) seguida por un anticuerpo anti-conejo conjugado a HRP. Las improntas se revelaron por quimioluminescencia (Amersham RPN 2209) seguida por auto-radiografía en películas Kodak X-mat AR.

Figura 40A representa células MCF7 no estimuladas (0) o estimuladas con IGF1 (50 ng/ml) solas (0+IGF-I) o combinadas con anticuerpos anti-IGF-IR monoclonales o humanizados (10 μg/ml) 7C10, 1H7, 7H2HM. Los anticuerpos 9G4 ó hIgG1 son inmunoglobulinas humanas o murinas de isotipo IgG1 usadas como control negativo de experimento. Las cadenas beta del IGF-IR se inmunoprecipitaron y transfirieron con anticuerpo anti-tirosina fosforilada. Los resultados obtenidos muestran que los anticuerpos anti-IGF-IR 7C10, 1H7 y 7H2HM monoclonales o humanizados inhiben la fosforilación de la tirosina de la cadena beta del IGF-IR.

Figura 40B representa células MCF7 no estimuladas (0) o estimuladas con IGF1 (50 ng/ml) solas (0+IGF-I) o combinadas con anticuerpos anti-IGF-IR monoclonales o humanizados (10 μg/ml) 7C10, 1H7, 7H2HM. Como ya se describió, los anticuerpos 9G4 ó hIgG1 son inmunoglobulinas humanas o murinas de isotipo IgG1 usadas como control negativo de experimento. El IRS-1 se inmunoprecipitó y se transfirió con anticuerpos anti-tirosina fosforilada. Los resultados obtenidos muestran que los anticuerpos monoclonales 7C10, 7H2HM y 1H7 inhiben la fosforilación de la tirosina del IRS-1.

Ejemplo 24: 7C10 y 7H2HM induce la internalización del IGF-IR

Células MCF7 y A549 se suspendieron con una concentración de 1.10^7 células/ml en PBS con 10% de suero bovino fetal (tampón FACS). 1.10^6 células se incubaron durante 30 minutos a 37°C con los anticuerpos monoclonales a 10 μg/ml (7C10, 7G3, 9G4) o a 20 μg/ml para 7H2HM. Luego de lavar, las células se marcaron a 4°C durante 30 minutos con un

anti-IGF-IR (anticuerpo monoclonal 12B1) biotininilado y, finalmente, se incubaron a 4°C durante 30 minutos con un conjugado de estreptavidina-488 alexa Fluor®. Las células se analizaron por FACScan (Becton-Dickinson, Enembogegem, Bélgica) con el software Cellquest luego de la eliminación de desechos.

Figura 41 muestra las células A549 sin coloración (1er pico), la células A549 se incubaron con 7C10 ó 7H2HM (2do pico) y las células A549 células se incubaron con una IgG1 de ratón o rata irrelevante (3er pico). Se observa una disminución del orden de 2 de la expresión en la superficie del IGF-IR por las células cuando las células se han incubado previamente con 7C10 ó 7H2HM.

Ejemplo 25: 7C10 y 7H2HM inducen la degradación del IGF-IR

Células MCF-7 se cultivaron durante 24 horas con una concentración de 10.10^4 células/cm^2 (75 cm^2, Costar) en 15 ml de medio completo. Seguidamente, los cultivos se lavaron tres veces con PBS y se incubaron durante 12 horas con medio desprovisto de suero. A continuación, las células se incubaron con cicloheximida a 25 μg/ml sola o con 10 μg/ml de anticuerpo monoclonal 7C10, 9G4, 7G3 ó de IGF1 (50 ng/ml). En ciertos experimentos, antes de la incubación con los anticuerpos monoclonales, las células se trataron durante 1 hora a 37°C con MG-132 (10 μM, Calbiochem 474791), con el fin de inhibir las actividades de proteasoma. Luego de la incubación, las células se lavaron y solubilizaron por la adición de un tampón de lisis. 20 μg de proteínas se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida a 8% de SDS y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa seguida por una inmunotransferencia de anti-cadena beta del IGF-IR, tal como se describe arriba con más detalle.

El análisis por inmunotransferencia (técnica Western) (Figura 42A) de la integridad del IGF-IR muestra que 7C10 y 7H2HM inducen la degradación del receptor, mientras que el ligando natural no ocasiona ninguna degradación del último. No se observa degradación del receptor con el 9G4, un anticuerpo irrelevante usado como isotipo control. Figura

42B demuestra, y con respecto ella, que la degradación se inhibe por un inhibidor de proteasoma MG132 (período de incubación de 2 horas).

Resultados comparables se obtuvieron con el anticuerpo humanizado 7H2HM (Figura 42C).

Se han realizado experimentos adicionales usando el 7C10 Mab murino y se ha demostrado que la degradación de IGF-IR es fuertemente dependiente de proteasoma, ya que el efecto de 7C10 se suprime totalmente en la presencia del inhibidor de proteasoma MG115 (Figura 57A). Esta propiedad parece ser particular a nuestro anticuerpo, ya que para otro anti-GF-IR descrito en la literatura o en patentes publicadas la regulación por disminución no ocurre mediante la ruta proteasómica (Sachdev et al., Cancer Res. 63:627-635, 2003; Burtrum et al. Cancer Res. 63, 8912-8921, 2003; Patente de los Estados Unidos 2004/0202655 A1 (Pharmacia)). Adicionalmente a esta ruta de degradación, el 7C10 MAb parece inducir asimismo la degradación de IGF-IR por las rutas lisosómicas/endosómicas, ya que se observó una reducción sustancial de regulación por disminución cuando las células se trataron con metilamina o cloroquina (Figuras 57 B y C).

Luego de la regulación por disminución el nivel de receptor permanece significativamente bajo por lo menos durante 31 horas (Figura 57D).

Ejemplo 26: Evaluación de la capacidad de 7C10 y h7C10 de unirse a IGF-IR y R-híbrido.

Ejemplo 26.1: Evaluación de la capacidad de 7C10 y h7C10 de inmunoprecipitar IGF-IR y R-híbrido purificado de células transfectadas respectivamente con IGF-IR e IR-A o IGF-IR y IR-B (denominados a partir de ahora R+/IR-A ó R+/IR-B

El objeto de este estudio es evaluar la capacidad de 7C10 y h7C10 de inmunoprecipitar IGF-IR, IR o R-híbrido.

7C10 y h7C10 se comparan con 17-69 (que reconoce tanto IGF-IR como R-híbrido).

394A
394

Método

La células utilizadas para este estudio se listan a continuación:

- R+: R-fibroblastos transfectados en forma estable con el IGF-IR (IGF-IR) cDNA
- R-/IR-A: R-fibroblastos transfectados en forma estable con el cADN de la isoforma del receptor de insulina A (IR-A)
- R-/IR-B:R-fibroblastos transfectados en forma estable con el cADN de la isoforma del receptor de insulina B (IR-B)
- R+/IR-A: R-fibroblastos transfectados en forma estable con el IGF1 y el cADN de la isoforma del receptor de insulina A y, por lo tanto, que expresan los receptores híbridos A (RsA-híbrido)
- R+/IR-B: R-fibroblastos transfectados en forma estable con el IGF1 y el cADN de la isoforma del receptor de insulina B y, por lo tanto, que expresan los receptores híbridos A (RsB-híbrido)

Para la obtención de un lisado de células, las células se solubilizaron en tampón RIPA, y se utilizaron 4 mg de proteína para inmunoprecipitación.

Los lisados de células se inmuprecipitaron en la siguiente forma:

R+ con 7C10 ó h7C10

R+/IR-A y R+/IR-B con 7C10 ó h7C10 ó 17-69

R-/IR-A y R-/IR-B con MA-20 (un anticuerpo anti-IR) o 7C10 ó h7C10

Luego de la inmunoprecipitación, la microesfera se resuspendió en 2X muestras de tampón y se sometieron a SDS-PAGE (7.5% de poliacrilamida).

Los filtros se transfirieron en la siguiente forma: Filtros que contenían lisados R+ (y, por lo tanto, únicamente IGF-IR) con subunidades β de anti-IGF-IR (Santa Cruz). Filtros que contenían lisados de todas las células restantes con un subunidades β de un anticuerpo anti-IR (Santa Cruz).

Results

Se muestran dos experimentos independientes (Fig.43A y Fig. 43B)

Comentarios

1) 7C10 y h7C10 son igualmente eficientes en inmunoprecipitar el IGF-IR (franjas 1 y 2)

2) 7C10 ni h7C10 inmunoprecipitan apreciablemente IR

3) 7C10 y h7C10 reconocen R-híbrido.

Ejemplo 26-2: Análisis de desplazamiento de IGF1 en IGF-IR por 7C10, h7C10 y 1H7

IGF-IR de lisados de células R+ se inmunocapturaron en placas Maxisorb recubiertas con anticuerpo 17-69.

Seguidamente se dejó a ^{125}I-IGF1 (Fig. 44) fijarse a receptores inmunocapturados en la ausencia o la presencia de concentraciones crecientes de ligando sin marcar (IGF1 ó IGF2) o anticuerpos (7C10, h7C10, 1H7, 9G4). Los resultados se grafican como porcentaje de unión específica máxima.

Tanto 7C10 como h7C10 desplazan IGF1 marcado con una eficiencia muy similar con valores IC_{50} menores a 100nM, y en este ejemplo con IC_{50} de alrededor de 1.3nM y 1.9 nM respectivamente. Por comparación, 1H7 fue mucho menos efectivo, con un valor IC_{50} hasta 100nM (Fig. 44).

Ejemplo 26-3: Análisis de desplazamiento de IGF1 en RsA-Híbrido por 7C10 h7C10 y 1H7

RsA-híbrido de lisados de células R+/IR-A se inmunocapturaron en placas Maxisorb recubiertas con anticuerpo 83-7 IR.

Seguidamente ^{125}I-IGF1 (Fig. 45) se dejó unirse a receptores inmunocapturados en la ausencia o la presencia de concentraciones crecientes de ligando sin marcar (IGF1 ó IGF2) o anticuerpos (7C10, h7C10, 1H7, 9G4). Los resultados se grafican como porcentaje de unión específica máxima.

Tanto 7C10 como h7C10 desplazan IGF1 marcado con una eficiencia muy similar con valores IC_{50} menores a 100 nM y, en este ejemplo, de alrededor de 2.0 nM para cada uno. Por comparación, 1H7 fue mucho

346
346

menos efectivo con un valor IC_{50} de hasta 50 nM, preferiblemente hasta 100 nM (Fig. 45).

Ejemplo 26-4: Análisis de desplazamiento de IGF1 en RsB-Híbrido por 7C10, h7C10 y 1H7

RsB-híbrido de lisados de células R-/IR-B se inmunocapturaron en placas Maxisorb recubiertas con anticuerpo 83-7.

Se dejó entonces a ^{125}I-IGF1 (Fig. 46) unirse a receptores inmunocapturados en la ausencia o la presencia de concentraciones crecientes de IGF1 e IGF2 o anticuerpos (7C10, h7C10, 1H7, 9G4). Los resultados se grafican como porcentaje de unión máxima.

Tanto 7C10 como h7C10 desplazan IGF1 marcado con una eficiencia muy similar con valores IC_{50} menores a 100nM y, en este ejemplo, de alrededor 1.5 y 2.5 respectivamente. Por comparación, 1H7 fue mucho menos efectivo con un valor IC_{50} hasta 100nM (Fig. 46).

EJEMPLO 27: Estudios de internalización y degradación del IGF-IR

Estudios de internalización y degradación se llevaron a cabo mediante análisis de transferencia Western y FACS. Los estudios de internalización se realizaron mediante análisis FACS usando un anticuerpo monoclonal (Mab) anti-IGF-IR biotinilado murino, descrito a partir de ahora como 12B1 MAb y fijándolo a un epítopo diferente del reconocido por los anticuerpos 7C10 y h7C10. El 7G3 MAb, un anti-IGF-IR no neutralizante se introdujo como control negativo. Ambos anticuerpos se generaron en nuestro laboratorio. Células MCF-7 confluyentes de tripsinizaron, y $1x10^6$ células de cada suspensión celular se esparcieron sobre placas de 96 pocillos en tampón FACS. Las placas se incubaron, con o sin 25 μg/ml de cicloheximida (Calbiochem), 30 minutos a 37°C con IGF1 (50 ng/ml) o con 10 μg/ml de 7C10, 7G3, h7C10, mIgG1, hIgG1. Células incubadas con tampón FACS únicamente se usaron para determinar el nivel basal de expresión del IGF-IR. A continuación las células se lavaron dos veces, y se agregaron 12 μg/ml de 12B1 MAb biotinilado a la placa. Luego de 30

minutos de incubación a 4°C para evitar la internacionalización del receptor, las células se lavaron 3 a 4°C y se tiñeron por la adición de un conjugado Alexa Fluor® 488 estreptavidina (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Holanda).

7C10 y h7C10 ocasionan una rápida regulación por disminución del IGF-IR con un máximo después de 4 horas de incubación con los anticuerpos (Tabla 12). No se observó regulación por disminución cuando las células se incubaron con IGF1, Mab no neutralizante 7G3, isotipo control (mIgG1) murino o (hIgG1) humano. La ausencia de internalización cuando las células se incubaron con IGF1 se debe probablemente al rápido reciclaje de IGF-IR; en efecto, este fenómeno de rápido reciclaje es bien conocido por el experto en el arte para este tipo de receptor. Estos resultados se observaron tanto en la presencia como en la ausencia de ciclohexemida. Los resultados observados se muestran en la siguiente Tabla 12.

Tabla 12

		Células incubadas sin Ciclohexemida			Células incubadas con Ciclohexemida		
		Tampón	mIgG1 biotinilado	12B1 biotinilado	Tampón	mIgG1 biotinilado	12B1 biotinilado
5 min	Tampón	8	8	135	8	8	90
	IGF1	8	9	137	8	9	93
1 h	Tampón	9	9	153	8	8	89
	hIG1	8	9	150	8	9	92
	H7C10	9	9	64	8	8	37
	mIgG1	8	9	144	8	8	88
	7C10	9	9	61	8	9	36
	7G3	8	9	137	8	8	85
4 h	Tampón	8	8	136	8	8	95
	hIgG1	8	8	139	7	8	94
	h7C10	8	8	39	8	8	29
	mIgG1	9	9	130	8	8	78
	7C10	8	8	37	8	8	27
	7G	8	8	109	8	8	72
16 h	Tampón	8	9	135	8	9	85
	HIgG1	9	9	144	8	8	85

	H7C10	9	10	34	8	9	26
	MIgG1	9	10	100	10	10	56
	7C10	9	9	31	9	9	25
	7G3	9	9	90	9	9	57

Tabla 12: Estudio de internalización IGF-IR inducida por anticuerpo mediante análisis FACS

Para experimentos de inmunotransferencia 7.5 X 10^6 células se platearon en matraces de $75cm^2$ en 15 ml de medio completo (RPMI libre de fenol rojo y Ham-F12K respectivamente para MCF-7 y A549, ambos suplementados con 10% FCS y 1% L-Glutamina). Veinticuatro horas después de ser esparcidas sobre las placas, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron durante 24 horas más a 37°C. Seguidamente el medio se retiró, y las células se incubaron 1 hora, 4 horas o 16 horas a 37°C con 15 ml de medio libre de suero con o sin anticuerpos a probarse o con IGF-I. Las células se recogieron entonces y se sometieron a lisis en tampón TrisHCl pH 7.5, 15% NaCl 1M (Sigma), 10% de mezcla de detergente (10 mM Tris-HCl, 10% Igepal) (Sigma), 5% deoxicolato de sodio (Sigma), 1 tableta Cocktail complete TM (Roche) de inhibidor de proteasa y 1% de inhibidor de fosfatasa Cocktail Set II (Calbiochem). Para análisis de transferencia Western, una cantidad igual de lisados de células se separaron en 10% SDS-PAGE, transferidos a filtros de nitrocelulosa, sondeados con un IgG policlonal en conejo anti-β IGF-IR (Santa Cruz Biotech), se revelaron con una IgG anti-conejo acoplada al HRP (Amersham Bioscience) y se visualizaron por ECL (Amersham Bioscience).

Figuras 47A y 47B representan el estudio de la degradación, inducida por anticuerpo, del IGF-IR.

Para análisis de inmnunotransferencia (Figuras 47A y 47B), se realizaron experimentos sin ciclohexemida. Tal como lo muestra el experimento anterior, no se observó diferencia en la presencia o en ausencia de este compuesto. 7C10 y h7C10 causan una internalización comparable del IGF-IR en las dos células A549 (A) y MCF-7 (B). En las células MCF-

7 la internalización máxima se observó después de cuatro horas de incubación con 7C10 y h7C10, mientras que para las células A549 la internalización máxima se observa tan temprano como 1 hora. No se observó degradación cuando las células se incubaron con IGF-I, 7G3 o isotipo control (mIgG1) murino o (hIgG1) humano.

EJEMPLO 28: Estudio de la ruta de degradación de IGF-IR

7.5 X 10^6 células MCF-7 se esparcieron sobre placas en matraces de 75 cm^2 en 15 ml de medio completo (RPMI libre de rojo fenol suplementado con 10% FCS y 1% L-Glutamina). Veinticuatro horas después de esparcidas sobre las placas, las células se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron durante 24 horas más a 37°C en 15 ml de medio libre de suero. Entonces se retiró el medio, y las células se incubaron durante dos horas en 7.5 ml de medio libre de suero que contenía 30μM MG115 o DMSO. A continuación, se agregaron 7.5 ml de medio libre de suero con o sin 7C10, hIgG1 o IGF1 durante 4 horas más. Las células se recogieron entonces y se sometieron a lisis en tampón TrisHCl pH 7.5, 15% NaCl 1M (Sigma), 10% mezcla de detergente (10 mM Tris-HCl, 10% Igepal) (Sigma), 5% de deoxicolato de sodio (Sigma), 1 tableta (Roche) Cocktail complete TM de inhibidor de proteasa y 1% de inhibidor de fosfatasa Cocktail Set II (Calbiochem). Para el análisis de inmunotransferencia Western, se separó una cantidad igual de lisados de células en 10% SDS-PAGE, se transfirieron a filtros de nitrocelulosa, se sondearon con una IgG policlonal en conejo anti-β IGF-IR (Santa Cruz Biotech), se revelaron con una IgG anti-conejo acoplada al HRP (Amersham Bioscience) y se visualizaron por ECL (Amersham Bioscience). La Figura 48 muestra los resultados obtenidos.

Para caracterizar aún más la ruta de degradación del anticuerpo h7C10, se incubaron células durante 4 horas con IGF1 o isotipo control humano (hIgG1) en la presencia o la ausencia del inhibidor de proteasoma MG115. En el experimento aquí descrito h7C10 indujo una degradación dramática del IGF-IR en la presencia o en ausencia de DMSO. No se

observó degradación cuando se agregaron IGF1 o hIgG1. Cuando las células se incubaron con 30 pM MG115, no se observó regulación por disminución del IGF-IR, demostrando que la regulación por disminución de IGF-IR en MCF-7, observada en Figura 2, ocurre por la ruta proteasoma. Esta propiedad es sorprendente y de particular interés. En efecto ninguno de los anticuerpos anti-IGF-IR ya descritos para inducir una degradación del IGF-IR (Malauney EK and al, Cancer Research, 2003; Sachdev D and al, Cancer Research, 2003) involucró la ruta proteasoma para degradación.

Actualmente, se ha informado que IGF-IR se internaliza y degrada por una ruta dependiente de lisosoma (Alessi et al., B. Curr. Biol., 1997). Además, Mab391 (Hailey et al., Molecular Cancer Therapeutics, 2002) y scFv-Fc (Sachdev et al., Cancer Research, 2003) regulan por disminución IGF-IR por la ruta endocítica.

Como consecuencia, considerando el presente conocimiento, no se puede excluir que h7C10 regule también por disminución, además de la ruta proteasoma como se describió previamente, por otras rutas conocidas y descritas para los anticuerpos anti-IGF-IR, es decir rutas dependientes de lisosoma y/o endocíticas.

Tal propiedad, si se valida, es de particular interés ya que demostraría la capacidad del h7C10 de interactuar con diferentes rutas de señalización/degradación y, por consiguiente, su eficacia terapéutico. Estudios adicionales se encuentran en camino para validar esta hipótesis.

Ejemplo 29: Actividad anti-tumoral del anticuerpo murino 7C10 administrado conjuntamente con anticuerpo anti-VEGF en ratones ortotópicamente implantados con células A549

Un millón de NSCLC A549 se implantaron a través de la pared torácica en el espacio de la cavidad pleural izquierda de ratones inmunitariamente desprotegidos Swiss de 6 semanas de edad siguiendo el protocolo descrito por Klaus-Berthier et al. (Kraus-Berthier, L., Jan, M., Guilbaud, N., Naze, M., Pierre, A., and Atassi, G. Histology and sensitivity to anticancer drugs of two human non-small cell lung carcinomas implanted

in the pleural cavity of nude mice. Clin. Cancer Res. 6(1):297-304, 2000). Siete días después de la inyección de las células, los ratones se trataron i.p. con una dosis de carga de 250 μg de anticuerpos y, luego, dos veces a la semana con 125 µg de anticuerpos. Para la terapia combinada, los anticuerpos se mezclaron antes de la inyección.

El anticuerpo anti-VEGF se usó como IgG2b, clon 26503.11 comercializado por SIGMA. Se describió como anticuerpo neutralizante (Ferrara N. et al., Biochem. Res. Com. 161:851, 1999; Ferrara et al., Endocrinol. Review, 13:18, 1992; Leung D.W. et al., Science 246:1306, 1989).

Figura 48 muestra que una terapia combinada aumenta dramáticamente el tiempo de supervivencia comparado con ratones no tratados o con ratones tratados con terapia única.

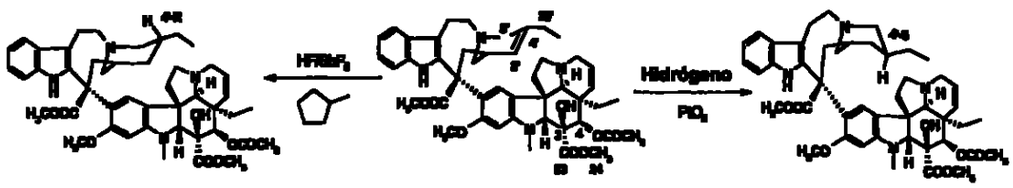
Los T/C% se calculan de acuerdo con la siguiente fórmula, [MEDIA DE RATONES TRATADOS / MEDIA DE RATONES DE CONTROL x 100]. Los T/C% obtenidos son alrededor de 134% y 144% para el 7C10 y anticuerpo anti-VEF respectivamente. Para el tratamiento combinado 7C10 + anticuerpos anti-VEGF, el T/C% es 188%.

Como conclusión, igualmente a la administración conjunta de 7C10 + 225 (ver ejemplo 22), la administración conjunta de 7C10 + anticuerpos anti-VEGF incrementan la supervivencia de los ratones.

Ejemplo 30: Producción de deoxivinblastina

4'-R deoxivinblastina (para su estructura, ver Esquema 1, más adelante) se obtiene por reducción iónica de anhidrovinblastina de acuerdo con un proceso conocido por los expertos en el arte (Lafitte C et al., Tetrahedron Letters, 1998, Volume 39, pp. 8281-8282).

4'-S deoxivinblastina, o 4'-S deoxileurosidina, se obtiene por hidrogenación catalítica de anhidrovinblastina de acuerdo con la técnica igualmente conocida por los expertos en el arte (De-Bruyn A. et al., Bulletin of the Belgian Chemical Society, 1983, Volume 92, number 5, pp 485-494).



Deoxivinblastina Anhidrovinblastina Deoxileurosidina

Esquema 1

Ejemplo 31: Deacetilación de alcaloides vinca diméricos

Deoxivinblastina o deoxileurosidina se disuelve y agita durante 4 horas a 50°C en 30 ml de metanol que contenía 1.2 equivalentes de metóxido de sodio. Esta solución se vierte entonces en agua helada con el fin de precipitar el compuesto formado. Luego de filtrar, lavar con agua y secar bajo vacío a 40°C, se obtiene 4-deacetildeoxivinblastina o 4-deacetildeoxileurosidina, con una pureza superior al 95%.

Ejemplo 32: Acoplamiento directo de 4'-deoxivinblastina (4' R) o 4'-deoxileurosidina (4' S) por reacción de función 4-carboxihidrazida en los anticuerpos anti-IGF-IR pre-oxidados

La 4'-deoxivinblastina o la 4'-deoxileurosidina se trata con hidrazina anhidra en solución en metanol y a temperatura ambiente. La reacción se monitorea por Cromatografía Analítica de Líquidos de Alta Eficacia (HPLC) y, cuando ha reaccionado el 95% del alcaloide de partida, el medio de reacción se trata con agua con el fin de separar la 4'-deoxivinblastina-3-deacetil-4-carbohidrazida o la 4'-deoxileurosidina-3-deacetil-4-carbohidrazida por filtración.

Luego de la cromatografía en gel de sílice y la cristalización, la 4'-deoxivinblastina-3-deacetil-4-carbohidrazida o la 4'-deoxileurosidina-3-deacetil-4-carbohidrazida es superior al 96% en pureza.

El anticuerpo anti-IGF-IR se oxida bajo condiciones frías en un tampón de acetato de sodio por tratamiento con metaperiodato de sodio. Luego de la cromatografía de exclusión, el anticuerpo anti-IGF-IR oxidado,

403
A03

en solución en un tampón de acetato, se trata en condiciones frías con la 4'-deoxivinblastina-3-deacetil-4-carbohidrazida o la 4'-deoxileurosidina-3-deacetil-4-carbohidrazida.

El inmunoconjugado así obtenido se separa del alcaloide vinca residual no conjugado y se purifica por cromatografía de exclusión con un tampón de fosfato a pH 7.4 y, a continuación, diálisis intensiva. La ausencia del alcaloide vinca se verifica por HPLC analítica.

El inmunoconjugado se caracteriza en un gel de electroforesis tipo SDS PAGE (azul Coomassie y/o nitrato de plata), por cromatografía de exclusión (SEC, UV a 280 nm) y espectrometría de masas MALDI-TOF. El mapeo de los sitios de acoplamiento se lleva a cabo mediante análisis por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LCMS), luego de la digestión enzimática (tripsina y PNGasa F) (Laguzza et al., J. MED. CHEM., 1989, 32:548).

Ejemplo 33: Acoplamiento del la 4'-deoxivinblastina (4'R) o la 4'-deoxileurosidina (4'S) a los anticuerpos anti-IGF-IR con base en anhídrido succínico

La 3-deacetil-4'-deoxivinblastina o la 3-deacetil-4'-deoxileurosidina se trata con anhídrido succínico en piridina durante 24 horas a 20°C. La reacción se monitorea por HPLC analítica y, cuando ha reaccionado el 95% del alcaloide de partida, el medio de reacción se trata con agua con el fin de precipitar el hemisuccinato de 3-deacetil-4'-deoxivinblastina o el hemisuccinato de 3-deacetil-4'-deoxileurosidina. Después de filtrar y secar, el compuesto se purifica por HPLC preparativa de fase reversa usando una sílice injertada con C18 y un eluyente compuesto de acetonitrilo, metanol tampón de acetato de amonio.

El hemisuccinato de 3-deacetil-4'-deoxivinblastina o el hemisuccinato de 3-deacetil-4'-deoxileurosidina se trata con hidroxibenzotriazol y diciclohexilcarbodiimida en dimetilformamida a temperatura ambiente durante 24 horas y en la presencia de una cantidad catalítica de dimetilaminopiridina. Luego de filtrar, la solución se mezcla con el

404 A

anticuerpo monoclonal anti-IGF-IR a pH 8.6 durante 4 horas. El inmunoconjugado se separa del alcaloide vinca no conjugado mediante cromatografía de exclusión con un tampón de fosfato a pH 7.4. Una diálisis intensiva permite eliminar el alcaloide vinca no conjugado. El inmunoconjugado se caracteriza por electroforesis en gel SDS PAGE, por cromatografía de exclusión y por espectrometría de masas MALDI TOF. El mapeo de los sitios de acoplamiento se lleva a cabo por análisis de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LCMS), después de la digestión enzimática (tripsina), comparada con un mapa tríptico obtenido para el anticuerpo monoclonal no derivado (Schneck et al., Clin. Pharmacol. Ther., 1990, 47:36; Rowland et al., Cancer. Immunol. Immunother., 1985, 19:1).

Ejemplo 34: Acoplamiento de la 4'-deoxivinblastina (4'R) o la 4'-deoxileurosidina (4'S) en un residuo con contenido de nitrógeno de los anticuerpos anti-IGF-IR con base en un puente disulfuro incluido en el ligamiento

La 3-deacetil-4'-deoxivinblastina o la 3-deacetil-4'-deoxileurosidina se trata en cloruro de metileno, a temperatura ambiente durante 24 horas, en la presencia de una cantidad catalítica de dimetilaminopiridina, con un gran exceso de ácido 3-metildisulfanilpropanoico y un gran exceso de diciclohexilcarbodiimida. El medio de reacción se trata convencionalmente, y el 3-metildisulfanilpropanoato de 3-deacetil-4'-deoxivinblastina o el 3-metildisulfanilpropanoato de 3-deacetil-4'-deoxileurosidina se purifica entonces por HPLC preparativa de fase reversa usando una sílice injertado con C18 y un eluyente compuesto de un tampón de acetonitrilo, metanol y acetato de amonio.

El 3-metildisulfanilpropanoato de 3-deacetil-4'-deoxivinblastina o el 3-metildisulfanilpropanoato de 3-deacetil-4'-deoxileurosidina se trata con ditiotreitol en una mezcla de agua y metanol, con el fin de obtener 3-sulfanilpropanoato de 3-deacetil-4'-deoxivinblastina o 3-sulfanilpropanoato de 3-deacetil-4'-deoxileurosidina, que se purificó por HPLC preparativa de

fase reversa usando una sílice injertado con C18 y un eluyente compuesto de un tampón de acetonitrilo, metanol y acetato de amonio.

El anticuerpo anti-IGF-IR se deriva con N-succinimidil 4-(2-piridilditio)propanoato (cuyo nombre de fábrica es SPDP) en 50 mM de tampón de fosfato de potasio, pH 6.5, que contenía 50 mM NaCl y 2 mM EDTA, durante 90 minutos. A esta solución de anticuerpo así derivado se agrega el 3-sulfanilpropanoato de 3-deacetil-4'-deoxivinblastina o el 3-sulfanilpropanoato de 3-deacetil-4'-deoxileurosidina disuelta en un mínimo de DMSO. Luego de contactar durante 24 horas, el inmunoconjugado se aísla por cromatografía de exclusión y se caracteriza en gel de electroforesis SDS PAGE, por cromatografía de exclusión y por espectrometría de masas MALDI TOF (Ojima et al., J. Med. Chem., 2002, 45:5320).

Ejemplo 35: Acoplamiento de la 4'-deoxivinblastina (4'R) o la 4'-deoxileurosidina (4'S) a los anticuerpos anti-IGF-IR con base en un función hidrazida terminal llevada a cabo por un ligamiento conectado al alcaloide vinca

La 3-deacetil-4'-deoxivinblastina o la 3-deacetil-4'-deoxileurosidina se trata en cloruro de metileno a temperatura ambiente durante 24 horas, en la presencia de una cantidad catalítica de dimetilaminopiridina, con un exceso de metil monoéster de ácido 1,6-hexanodicarboxílico y un exceso de diciclohexilcarbodiimida. El medio de reacción se trata convencionalmente, y luego el 3-metoxicarbonilpentanoato la 3-deacetil-4'-deoxivinblastina o el 3-metoxicarbonilpentanoato la 3-deacetil-4'-deoxileurosidina se purifica luego por HPLC preparativa de fase reversa usando una sílice injertada con C18 y un eluyente conformado por un tampón de acetonitrilo, metanol y acetato de amonio.

El 3-metoxicarbonilpentanoato la 3-deacetil-4'-deoxivinblastina o el 3-metoxicarbonilpentanoato la 3-deacetil-4'-deoxileurosidina se trata por defecto con hidrazina anhidra en solución en metanol a temperatura ambiente. La reacción se monitorea por HPLC analítica y, cuando el 70% del alcaloide de partida ha reaccionado, el medio de reacción se evapora y el

406

3-hidrazinocarbonilpentanoato de 3-deacetil-4'-deoxivinblastina o el 3-hidrazinocarbonilpentanoato de 3-deacetil-4'-deoxileurosidina se purifica por HPLC preparativa de fase reversa usando una sílice injertada con C18 y un eluyente conformado por tampón de acetonitrilo, metanol y acetato de amonio.

La oxidación del anticuerpo anti-IGF-IR, el acoplamiento con 3-hidrazinocarbonilpentanoato de 3-deacetil-4'-deoxivinblastina o el 3-hidrazinocarbonilpentanoato de 3-deacetil-4'-deoxileurosidina, la purificación y la identificación se llevan a cabo de acuerdo con las mismas técnicas a las descritas en Ejemplo 32.

Ejemplo 36: Actividad, comparada *in vivo*, de los anticuerpos 7C10 y h7C10 en los modelos A549 y MCF-7

Con el fin de confirmar la actividad de anticuerpo h7C10 humanizado *in vivo*, éste último se comparó con 7C10 en el modelo de tumor de mama dependiente de estrógeno MCF-7 y en modelo de tumor de pulmón amicrocítico A549.

Para hacerlo, 5.10^6 células A549 se implantaron subcutáneamente en ratones inmunitariamente desprotegidos. Cinco días después de este implanten, los tumores se midieron, y se formaron grupos de 6 ratones. Estos grupos se trataron, respectivamente, con 1) el anticuerpo 7C10 inyectado ip (intraperitonealmente) a una tasa de 125 µg/dosis dos veces por semana; 2) el anticuerpo h7C10 inyectado bajo las mismas condiciones que su forma murina; 3) PBS (previamente se había demostrado que los isotipos humanos y murinos de control no modifican el perfil de crecimiento del tumor, comparado con el tratamiento de los animales con PBS). En el modelo de tumor de mama MCF-7, un gránulo de estradiol de liberación sostenida (0.72 mg/tableta liberados durante 60 días) se implanta subcutáneamente 24 horas antes del implante de las células. Este gránulo es esencial para el establecimiento de cualquier tumor humano dependiente de E2 en esta especie animal.

Figuras 50 y 51 muestran, como se esperaba, que se observa una inhibición significativa del crecimiento del tumor con el anticuerpo murino 7C10. En lo que respecta al anticuerpo humanizado h7C10, la actividad observada es de exactamente la misma intensidad a la observada con su contraparte murina, independientemente del modelo utilizado. Este dato indica que la humanización no modificó las propiedades del anticuerpo generado.

Ejemplo 37: Demostración de las actividades comparadas de vinblastina, vincristina, 4'S-deoxivinblastina y 4'R-deoxileurosidina

La mayor actividad de la (4'R) deoxivinblastina y la (4'S) deoxileurosidina se demostró *in vivo* contra leucemia murina P388 injertada por vía intravenosa y se comparó con la actividad de vinblastina y vincristina probadas bajo las mismas condiciones. El protocolo para esta prueba se describe por Kruczynski A. et al., Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 1998, volume 41, pages 437 to 447.

Para hacerlo, un total de 10^6 células de leucemia murina P388 se implantaron i.v. en ratones CDF1 el día 0. Luego de la aleatorización de los animales en jaulas para tratamiento con cada alcaloide y jaulas de control, se administraron los compuestos i.p. el día 1.

Convencionalmente, la actividad *in vivo* de los compuestos se expresa por el aumento en el tiempo de supervivencia. El tiempo de supervivencia se expresa por el T/C a una dosis expresada en mg por kg (mg/kg). El T/C corresponde a la relación, multiplicada por 100, de la media del tiempo de supervivencia de los animales tratados respecto a la media del tiempo de supervivencia de los animales de control. De acuerdo con los criterios estándar de la NCI, un T/C de 120 corresponde a un nivel mínimo para concluir que la actividad está presente.

Un T/C de entre 120 y 175 permite concluir que hay una actividad significativa y un T/C superior a 175 permite concluir que hay un elevado nivel de actividad anti-leucemia. Un T/C por debajo de 75 expresa toxicidad del compuesto de prueba en la dosis administrada.

La siguiente Tabla 13 presenta los resultados obtenidos con un mínimo de 7 y un máximo de 15 ratones tratados para cada grupo de animales tratados con alcaloide vinca o para el grupo de control.

Tabla 13 presenta los resultados de los valores T/C obtenidos para cada alcaloide vinca probado. Figuras 52 y 53 muestran la mayor actividad anti-leucemia de las 4'R y 4'S deoxivinblastinas comparada con vinblastina y vincristina.

Tabla 13

Dosis en mg/kg	0.63	1.25	2.5	5	10	20	40
T/C para vinblastina	114	114	129	143	57		
T/C para vincristina	114	143	143	100	57		
T/C para 4'-S-deoxivinblastina	114	143	200	100	27		
T/C para 4'-R-deoxivinblastina	100	100	129	143	200	214	43

Ejemplo 38: Demostración de la actividad antitumoral *in vivo* de 4'R- y 4'S-deoxivinblastina conjugadas con anticuerpos IGR-IR en tumores humanos de varios orígenes

Con el fin de demostrar el beneficio de direccionar los compuestos de quimioterapia (4'R) y (4'S) deoxivinblastina (designadas respectivamente RDV y SDV en Figura 5) con un anticuerpo humanizado dirigido contra IGF-IR, 5.10^6 células de cáncer de pulmón amicrocítico A549 se implantaron en un punto subcutáneo en el costado derecho de ratones Swiss inmunitariamente desprotegidos. Siete días después del implante de las células, los tumores pueden medirse, y los animales se distribuyen aleatoriamente en 6 grupos de 6 ratones y se tratan de acuerdo con el siguiente protocolo:

- h7C10: dos veces a la semana a una tasa de 250 µg/dosis de principio a fin del experimento;

- RDV y SDV: 4 inyecciones intraperitoneales con intervalos de 7 días con una dosis de 0.35 mg/kg, que corresponde a la dosis de cada uno de los compuestos presentes en los conjugados;
- los grupos de animales, a los que se administraron los compuestos de quimioterapia acoplados al anticuerpo, reciben respectivamente 0.35 mg/kg de cada uno de los agentes de quimioterapia y 250, g/dosis de anticuerpos. Estos conjugados se administran de acuerdo con los mismos modos que los grupos a los que se administraron los compuestos de quimioterapia solos;
- a los animales del lote de control se aplican inyecciones de PBS, administrado de acuerdo con la misma frecuencia.

El peso de los ratones y el volumen del tumor se evalúan dos veces a la semana. Los volúmenes del tumor se calculan de acuerdo con la fórmula: ½ (largo. ancho. alto).

Los resultados se muestran en Figura 53.

Los animales a los que se administró únicamente RDV o SDV evolucionan en la misma forma que el grupo de control, lo cual parece coherente con respecto a las dosis óptimas inyectadas usualmente para estos dos compuestos, que son respectivamente 20 mg/kg y 2.5 mg/kg. Sorpresivamente, cuando cada uno de los compuestos se acopla al anticuerpo h7C10, se observa una inhibición muy significativa del crecimiento del tumor. Esta inhibición es significativamente mayor que la observada con el anticuerpo solo, administrado en la misma concentración.

Todos estos resultados parecen indicar que el direccionamiento de las células con el anticuerpo h7C10 promueve la concentración del medicamento en la célula a tomarse como diana y permite observar, como resultado, inhibiciones significativas de proliferación del tumor con dosis bajas de producto de quimioterapia y, en particular, con dosis que son completamente atóxicas en ratones, como se demuestra por la pérdida de peso de los animales (datos no comunicados).

EJEMPLO 39: Regulación por disminución *in vivo* de IGF-IR

AD 41.0

Para confirmar si las observaciones previas *in vitro* (Ejemplos 24 y 25) de regulación por disminución de niveles de IGF-IR de 7C10 y h7C10 era uno de los mecanismos responsables de la inhibición del crecimiento de tumores *in vivo*, se probó el efecto de h7C10 sobre los niveles de IGF-IR en ratones con tumores de xenoinjerto MCF-7. Se estudiaron nueve ratones portadores de un tumor de xenoinjerto. Los tumores se extirparon de 3 ratones antes del tratamiento (descrito como TO en Figura 59). Luego 3 ratones recibieron inyecciones i.p. de 1 mg de A2CHM y otros 3 ratones recibieron inyecciones i.p. de una hIgG1 usada como isotipo control. Seis horas después del tratamiento, los ratones fueron sacrificados y se recolectaron los tumores. Se congelaron las muestras de los tumores en nitrógeno líquido y se homogeneizaron en un tampón de lisis. Un total de 50 µg de extractos de tumor se inmunotransfirieron para detectar los niveles totales de IGF-IRb. En este experimento, la citoqueratina 19 (CK19) se inmunotransfirió con un anticuerpo que reconoce específicamente el CK19 de células MCF-7 como control de la cantidad de proteína del tumor cargada en cada franja. Figura 59 muestra que la cantidad de proteína cargada es comparable en todas las franjas, con excepción de la franja 9 que no pudo considerarse interpretable. Todos los tumores de xenoinjerto MCF-7 tenían altos niveles de IGF-IR en los ratones no tratados (franjas 1-3). Seis horas después del tratamiento, el tumor extraído de animales tratados con h7C10 tuvo una significativa regulación por disminución de IGF-IR (franjas 4-6). En dos ratones que recibieron el isotipo control no se observaron cambios en el nivel de IGF-IR en el tejido tumoral (franjas 7 y 8). Estos resultados confirman la regulación por disminución de IGF-IR es uno de los mecanismos involucrados en la actividad *in vivo* de h7C10.

Ejemplo 40: Estirpes celulares con sobre-expresión y/o activación anormal de IGF-IR:

Las siguientes estirpes celulares son conocidas por sobre-expresar y/o presentar IGF-IR sobre-activado:

- próstata (PC3, DU145),

- mama (MCF-7, T47D, BT20, ZR-75-1, MDA-MB-231,
- pulmón (A549, A427, SK-LU-1)
- colon (HT29, Colo205, CaCo-2),
- tiroides (BC-PAP, FRO, ARO),
- ovarios (SK-OV-3),
- páncreas (BxPC3, MiaPaCa-2, LN36),
- cáncer renal, suprarrenal, sarcomas (SK-ES-1), meduloblastoma (Daoy, TE-671, D283 Med),
- retinoblastoma, mieloma múltiple (MM-1S, MM-1R), melanoma (SK-MEL-28)

El nivel de expresión de algunas de las células descritas más arriba puede determinarse en la siguiente forma:

Para determinar el nivel de expresión de IGF-IR en varias estirpes celulares, las células se marcaron con 5 µg/ml de anticuerpo 7C10. 9G4 se utilizó como isotipo control irrelevante. Se empleó MAb anti-ratón acoplado a FITC para la revelación del 7C10 ligado. En paralelo, microesferas de DAKO QIFIKIT, que contenían cantidades cuantificadas de receptores CD5, se utilizaron para determinación de la curva estándar. Luego del análisis FACS, las microesferas producen un MFI. Se determinó una curva estándar relativa a MFI y un número de receptor. Se informó MFI, medido luego de la tinción celular con 7C10, en la curva estándar, y se determinó el número de receptor en cada estirpe celular del tumor.

La cuantificación del número de IGF-IR en la superficie de la estirpe celular del tumor muestra que todas las estirpes celulares analizadas expresan entre 1.200 a 96.000 receptores/células.

Algunos resultados preferidos son:

- IGF-IR	(MFI±sd)
- JURKAT	1201±833
- PC3	3903±1178
- CAKI 1	15887±nd
- T29	17102±2210
- A431	18530±2126

412

- LnCAP	19738±1080
- COLO205	23355±5711
- BxPC3	25185±3463
- A549	32179±5418
- CAKI 2	42673±693
- MCF-7	96072±2807

Ejemplo 41: Estirpes celulares que expresan R-híbrido:

Las siguientes estirpes celulares son conocidas por sobre-expresan y/o desplegar un R-híbrido sobre-activado y/o IGF-IR (Siddle et al.Horm. Res. 41: 56-65, 1994; Lynn Seely et al. Endocrinology. 136: 1635-1641, 1995 and Pandini et al. Clinical Cancer Res. 5: 1935-1944. 1999):

- cáncer de mama (MDA-MB-231, MDA-MB-157, MDA-MB-468, MDA-MB-453, ZR-75),
- cáncer de tiroides (BC-PAP)

Ejemplo 42:

Para determinar la variación de IGF-IR entre tejidos normales y tumorales, secciones insertadas en parafina de cáncer de mama o cáncer de tiroides se tiñeron con un anticuerpo monoclonal anti-IGF-IR biotinilado-conjugado. El resultado mostrado en Figura 58 demuestra que muestras de pacientes con cáncer de mama o tiroides despliegan niveles de IGF-IR significativamente más altos.

Ejemplo 43: Marcadores Tumorales

Marcadores	Valores Normales	Tipos de Cáncer Asociados
ACE	< 5 ng/ml (para no fumadores) < 10 ng/ml (para fumadores)	Colorrectal, pancreático, gástrico, mama, pulmón, tiroides
aFP	<15 ng/ml	Hígado, testículos
ßHCG	<0,1 ng/ml	Testículos, placenta (durante el embarazo)

413
AB

CA125	< 35 U/ml	Ovarios
CA15.3	< 30 U/ml	Mama
CA19.9	< 37 U/ml	Páncreas, sistema digestivo
CA 72.4	< 6 U/ml	Estómago, ovarios
CYFRA 21.1	< 3,3 ng/ml	Cáncer amicrocítico
5-HIAA urinario	5 a 45 mmol/24 h	Carcinoide (sistema digestivo)
NSE	< 12,5 ng/ml	Cáncer pulmonar microcítico, sistema nervioso central (neuroblastoma)
SCC	<1,5 ng/ml	Útero, cabeza y cuello
PSA total: PSA libre:	< 4 ng/ml 10 a 40% de PSA total	Próstata
TG (tiroglobulina)	<3 µg/l	Tiroides
CT (calcitonina)	< 10 ng/l	Tiroides
LDH (lacticodeshidrogenasa)	<2N	Osteosarcoma

Tabla 14

Las siguientes referencias no limitantes se incorporan por referencia y describen varios marcadores preferidos.

- PSA: Anaes, Service des recommendations professionnelles et service évaluation économique, September 2004;
- ACE: Fletcher 1986, Carcinoembryonic antigen. Ann. Intern. Med., 104(1): 66-73; American Society, 1996, J. Clin. Oncol. 14 (10): 2843-77;
- CA19.9: Narimatsu et al., 1998, Cancer Res., 58(3):512-8; Vestergaard et al., 1999, Clin. Chem., 45(1): 54-61;
- CA15.3: Hayes et al., 1986, J. Clin. Oncol., 4(10):1542-50; Safi et al., 1989, Int. J. Biol. Markers, 4(4): 207-14; Devine et al., 1995, Breast Cancer Res. Treat., 34(3):245-51; Yasasever et al., 1994, Eur. J. Gynaecol. Oncol., 15(1):33-6;
- TG: National Academy, 2001, [on-line], URL:http//www.nacb. org/thyroid_LPMG.htm; Piechaczyk et al., 1989, Clin. Chem., 35

(3):422-4; Marquet et al., 1996, Clin. Chem., 42(2):258-62;

- CT: Motte et al., 1988, Clin. Chem. Acta, 174(1):35-54; Niccoli et al., 1997, J. Clin. Endocrinol. Metab., 82(2):338-41;
- LDH: Meyers et al., 1992, J. Clin. Oncol., 10(1):5-15;

Pueden utilizarse otros marcadores genéticos, por ejemplo (De Vita, Hellman & Rosemberg, "Cancer, Principles and Practice of Oncology", 6th edition, Edition Lippincott Williams & Wilkins, Chapter 26, page 653):

- mama: amplificación de Her2/NEU/ERBB2 o mutación de BRCA1, BRCA2
- próstata: PSA mRNA
- vejiga: mutación TP53
- colon: mutación KRAS
- riñón: mutación NF1, NF2.

A15
U15

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado, o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizándose dicho anticuerpo, o uno de sus dichos fragmentos, porque es capaz de unirse al R-híbrido, isoforma(s) A y/o B, e inhibir la unión de sus ligandos nativos, designado preferiblemente aquí como IGF1 y/o IGF2 y/o insulina, y/o capaz de inhibir específicamente la actividad tirosina cinasa de dicho R-híbrido, comprendiendo dicho anticuerpo aislado una cadena ligera que incluye por lo menos una región determinante complementaria CDR, seleccionada de las CDRs de secuencia SEQ ID No. 2, 4 y 6, y/o comprendiendo una cadena pesada que incluye por lo menos una CDR. seleccionada de las CDRs de secuencia SEQ ID No. 8, 10 y 12.

2. El anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, como se reivindica en la reivindicación 1, caracterizado porque es asimismo capaz de unir el IGF-IR e inhibir la unión de sus ligandos nativos, designado preferiblemente aquí como IGF1 y/o IGF2, y/o capaz de inhibir específicamente la actividad tirosina cinasa de dicho IGF-IR.

3. El anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, como se reivindica en la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque comprende una cadena pesada que incluye por lo menos una CDR seleccionada de las CDRs de secuencia SEQ ID No. 8, 10 y 12.

4. El anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, como se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque comprende una cadena pesada que incluye por lo menos dos de las tres CDRs o las tres CDRs de secuencia SEQ ID No. 8, 10 y 12.

5. El anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, como se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque comprende una cadena ligera que contiene por lo menos una CDR seleccionada de las CDRs de secuencia SEQ ID No. 2, 4 y 6.

6. El anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, como se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque

comprende una cadena ligera que contiene por lo menos dos de las tres CDRs o las tres CDRs de secuencia SEQ ID No. 2, 4 y 6.

7. El anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, como se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque no se une en una forma significativa al receptor de insulina humano IR.

8. El anticuerpo como se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque dicho fragmento funcional se selecciona de los fragmentos Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fab', scFv, scFv-Fc, scFv-CH3 y los diacuerpos, o cualquier fragmento cuya semivida se habría aumentado, tal como fragmentos pegilados.

9. Un hibridoma murino capaz de segregar un anticuerpo como se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 8.

10. El hibridoma murino como se reivindica en la reivindicación 9, depositado en el CNCM, Instituto Pasteur, París, el 19 de septiembre de 2001 bajo el número I-2717.

11. Un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, caracterizado porque dicho anticuerpo se segrega por el hibridoma como se reivindica en la reivindicación 10.

12. El anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, como se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque dicho anticuerpo comprende una cadena ligera de secuencia que contiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 54, y/o porque comprende una cadena pesada de secuencia que contiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 69.

13. El anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, como se reivindica en la reivindicación 12, caracterizado porque dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico y, por otra parte, contiene las regiones constantes de cadena ligera y cadena pesada, derivadas de un anticuerpo de una especie heteróloga al ratón.

14. El anticuerpo quimérico, o uno de sus fragmentos funcionales, como se reivindica en la reivindicación 13, caracterizado porque dicha especie heteróloga es el hombre.

15. El anticuerpo quimérico, o uno de sus fragmentos funcionales, como se reivindica en la reivindicación 14, caracterizado porque las regiones constantes de cadena ligera y cadena pesada, derivadas de un anticuerpo humano, son respectivamente la región kappa o lambda y gamma-1, gamma-2 o gamma-4.

16. El anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, como se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado y contiene una cadena ligera y/o una cadena pesada, en la cual los segmentos del esqueleto FR1 a FR4 de dicha cadena ligera y/o cadena pesada se derivan respectivamente de segmentos del esqueleto FR1 a FR4 de cadena ligera y/o cadena pesada de anticuerpo humano.

17. El anticuerpo humanizado, o uno de sus fragmentos funcionales, como se reivindica en la reivindicación 16, caracterizado porque dicho anticuerpo comprende una cadena ligera que contiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 61 ó 65, y/o porque comprende una cadena pesada que contiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 75, 79 u 83.

18. El anticuerpo humanizado, o uno de sus fragmentos funcionales, como se reivindica en la reivindicación 16 ó 17, caracterizado porque dicho anticuerpo comprende una cadena ligera que contiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 65, y/o porque comprende una cadena pesada de secuencia que contiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 79 u 83, preferiblemente SEQ ID No. 83.

19. Un ácido nucleico aislado, caracterizado porque se selecciona de los siguientes ácidos nucleicos:

a) un ácido nucleico, ADN o ARN, que codifica para un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, como se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 8 y 11 a 18;

b) un ácido nucleico complementario de un ácido nucleico tal como se define en a); y

418

c) un ácido nucleico de por lo menos 18 nucleótidos, capaz de hibridar bajo condiciones de alta rigurosidad con por lo menos una de las CDRs de la secuencia SEQ ID No. 1, 3, 5, 7, 9 u 11.

20. Un vector que contiene un ácido nucleico, como se reivindica en la reivindicación 19.

21. Una célula anfitriona que comprende un vector, como se reivindica en la reivindicación 20.

22. Un animal transgénico, con excepción del hombre, que comprende por lo menos una célula transformada por un vector, como se reivindica en la reivindicación 20.

23. Un proceso para la producción de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, como se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 8 y 11 a 18, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

a) cultivo, en un medio y en condiciones apropiadas de cultivo, de una célula como se reivindica en la reivindicación 21; y

b) la recuperación de dichos anticuerpos, o uno de sus fragmentos funcionales, así producidos del medio de cultivo o dichas células cultivadas.

24. Un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, capaz de obtenerse por un proceso como se reivindica en la reivindicación 23.

25. El anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 11 a 18 y 24, caracterizado porque, por otra parte, es capaz de unirse específicamente al receptor de factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR) y/o capaz de inhibir específicamente la actividad tirosina cinasa de dicho EGFR.

26. El anticuerpo como se reivindica en la reivindicación 25, caracterizado porque consiste de un anticuerpo bi-específico y porque comprende un segundo motivo que inhibe específicamente la unión del EGF al receptor de factor de crecimiento epidérmico humano EGFR y/o inhibe específicamente la actividad tirosina cinasa de dicho EGFR.

27. El anticuerpo como se reivindica en la reivindicación 26, caracterizado porque es bivalente o tetravalente.

28. El anticuerpo como se reivindica en una de las reivindicaciones 26 ó 27, caracterizado porque dicho segundo motivo se selecciona de los fragmentos Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fab', Fab'PEG, scFv, scFv-Fc, scFv-CH3 y los diacuerpos, o cualquier forma cuya semivida se habría incrementado.

29. El anticuerpo como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, caracterizado porque dicho segundo motivo anti-EGFR se deriva del anticuerpo monoclonal de ratón 225, su derivado quimérico ratón-hombre C225, o un anticuerpo humanizado derivado de este anticuerpo 225.

30. El anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, como se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 8, 11 a 18 y 24 a 29 como un medicamento.

31. Una composición que comprende a modo de principio activo un compuesto que consiste en o que comprende un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, como se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 8, 11 a 18 y 24 a 30.

32. La composición como se reivindica en la reivindicación 31, caracterizada porque comprende un segundo compuesto seleccionado de los compuestos capaces de inhibir específicamente la unión del EGF al receptor de factor de crecimiento epidérmico humano EGFR y/o capaces de inhibir específicamente la actividad tirosina cinasa de dicho EGFR.

33. La composición como se reivindica en la reivindicación 32, caracterizada porque dicho segundo compuesto se selecciona de los anticuerpos anti-EGFR aislados, o sus fragmentos funcionales, capaces de inhibir por competición la unión del EGF al EGFR.

34. La composición como se reivindica en la reivindicación 33, caracterizada porque dicho anticuerpo anti-EGFR se selecciona de anticuerpos anti-EGFR monoclonales, qiméricos o humanizados, o sus fragmentos funcionales.

35. La composición como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 33 ó 34, caracterizada porque dichos fragmentos funcionales del anticuerpo anti-EGFR se seleccionan de los fragmentos Fv,

Fab, $F(ab')_2$, Fab', scFv-Fc, scFv-CH3 y los diacuerpos, o cualquier fragmento cuya semivida se habría incrementado, como fragmentos pegilados.

36. La composición como se reivindica en una de las reivindicaciones 33 a 35, caracterizada porque dicho anticuerpo anti-EGFR es el anticuerpo monoclonal 225 de ratón, su derivado quimérico ratón-hombre C225, o un anticuerpo humanizado derivado de este anticuerpo 225.

37. La composición como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 31 a 36, caracterizada porque contiene, por otra parte, como producto de combinación para empleo simultáneo, separado o consecutivo, un agente citotóxico/citostático, un inhibidor de la actividad tirosina cinasa de los receptores para IGF1 y/o para EGF, un agente corticosteroide, un agente anti-emético, una vacuna contra el cáncer, un agente analgésico, un agente anti-vascular y/o un agente anti-proliferativo.

38. La composición como se reivindica en la reivindicación 37, caracterizada porque dicho agente citotóxico/citostático se selecciona de los agentes que interactúan con el ADN, los anti-metabolitos, los inhibidores de topoisomerasa I o II, o el inhibidor de husillo o agentes estabilizantes o, además, cualquier agente capaz de ser usado en quimioterapia.

39. La composición como se reivindica en la reivindicación 37 ó 38, caracterizada porque dicho agente citotóxico/citostático se acopla químicamente a por lo menos uno de los elementos de dicha composición para uso simultáneo.

40. La composición como se reivindica en la reivindicación 38 ó 39, caracterizada porque dicho agente citotóxico/citostático se selecciona del inhibidor de husillo o agentes estabilizantes, preferiblemente vinorelbina, vinflunina o vincristina.

41. La composición como se reivindica en una de las reivindicaciones 37 a 40, caracterizada porque dicho inhibidor de la actividad tirosina cinasa de los receptores para IGF1 y/o para EGF se selecciona del grupo conformado por agentes naturales derivados, dianilino-ftalimidas, pirazolo- o porrolopiridopirimidinas o, también, quinazilinas.

42. La composición como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 31 a 41, caracterizada porque contiene, por otra parte, otro compuesto anticuerpo dirigido contra el dominio extracelular del receptor HER2/neu, como un producto de combinación para uso simultáneo, separado o consecutivo, destinado para la prevención y el tratamiento de cáncer.

43. La composición como se reivindica en la reivindicación 42, caracterizada porque dicho anticuerpo dirigido contra el dominio extramembrana del receptor HER2/neu es Trastuzumab, o uno de sus fragmentos funcionales.

44. La composición como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 31 a 43, caracterizada porque uno, por lo menos, de dichos anticuerpos, o uno de sus fragmentos funcionales, se conjuga con una toxina celular y/o un radioelemento.

45. La composición, como se reivindica en una de las reivindicaciones 31 a 44, como un medicamento.

46. El uso de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, como se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 8, 11 a 18 y 24 a 30 y/o de una composición como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 31 a 45 para la preparación de un medicamento destinado a la prevención o al tratamiento de una enfermedad asociada con una sobre-expresión y/o activación anormal del R-híbrido y, en forma opcional, EGFR, y/o asociada con una hiperactivación de la ruta de transducción de la señal mediada por la interacción de IGF1 ó IGF2 o insulina con R-híbrido y, en forma opcional, de EGF con EGFR.

47. El uso de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, como se reivindica en la reivindicación 2 y en una de las reivindicaciones 3 a 8, 11 a 18 y 24 a 30, si dependiente de la reivindicación 2 y/o de una composición como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 31 a 45, si contiene un anticuerpo dependiente de la reivindicación 2, para la preparación de un medicamento destinado a la prevención o al tratamiento de de una enfermedad asociada con una sobre-expresión y/o una

activación anormal de ambos, el R-híbrido y el IGF-IR y, en forma opcional, EGFR, y/o asociada con una hiperactivación de la ruta de transducción de la señal mediada por la interacción de IGF1 ó IGF2 o insulina con R-híbrido y IGF1 ó IGF2 con IGF-IR y, en forma opcional, de EGF con EGFR.

48. El uso, como se reivindica en la reivindicación 46 ó 47, caracterizado porque la administración de dicho medicamento no induce, o sólo induce ligeramente, efectos secundarios asociados con la inhibición del receptor de insulina IR.

49. El uso, como se reivindica en una de las reivindicaciones 46 a 48, para la preparación de un medicamento destinado a inhibir la transformación de células normales en células con carácter tumoral, preferiblemente células dependientes de IGF, especialmente dependientes de IGF1 y/o IGF2, y/o células dependientes de EGF y/o células dependientes de HER2/neu.

50. El uso, como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones de 46 a 49, para la preparación de un medicamento destinado a inhibir el crecimiento y/o la proliferación de células tumorales, preferiblemente células dependientes de IGF, especialmente dependientes de IGF1 y/o IGF2, y/o dependientes de EGF y/o dependientes de HER2/neu.

51. El uso, como se reivindica en una de las reivindicaciones 46 a 50, para la preparación de un medicamento destinado a la prevención o al tratamiento de cáncer.

52. El uso, como se reivindica en la reivindicación 47 y 48 a 51, si dependiente de la reivindicación 47, caracterizado porque dicho cáncer es un cáncer seleccionado de cáncer de próstata, osteosarcomas, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer endometrial, cáncer pancreático, cáncer mieloide, cáncer de vejiga, cáncer de tiroides, melanoma o cáncer colorrectal.

53. El uso, como se reivindica en la reivindicación 46 y las reivindicaciones 48 a 51, si dependiente de la reivindicación 46, caracterizado porque dicho cáncer es cáncer de mama o cáncer de tiroides.

54. El uso, como se reivindica en una de las reivindicaciones 46 a 50, para la preparación de un medicamento destinado a la prevención o al tratamiento de psoriasis.

55. Un método de diagnóstico *in vitro* de enfermedades inducidas por una sobre-expresión o una subexpresión del R-híbrido y, en forma opcional, EGFR, a partir de una muestra biológica, en la cual se sospecha la presencia anormal de R-híbrido y, en forma opcional, EGFR; caracterizado porque dicha muestra biológica se pone en contacto con un anticuerpo como se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 8, 11 a 18 y 24 a 30, siendo posible marcar dicho anticuerpo, si es necesario.

56. Un método de diagnóstico *in vitro* de enfermedades inducidas por una sobre-expresión o una subexpresión de ambos, el R-híbrido y el IGF-IR y, en forma opcional, EGFR, a partir de una muestra biológica en la cual se sospecha la presencia anormal de ambos, el R-híbrido y IGF-IR y, en forma opcional, EGFR, caracterizado porque dicha muestra biológica se pone en contacto con un anticuerpo, como se reivindica en la reivindicación 2 y en una de las reivindicaciones 3 a 8, 11 a 18 y 24 a 30, si dependiente de la reivindicación 2, siendo posible marcar dicho anticuerpo, si es necesario.

57. Un kit o juego para llevar a cabo un método de diagnóstico de enfermedades inducidas por una sobre-expresión o una subexpresión del R-híbrido y, en forma opcional, EGFR, o para llevar a cabo un proceso para la detección y/o la cuantificación de una sobre-expresión o de una subexpresión del R-híbrido y, en forma opcional, EGFR, en una muestra biológica, preferiblemente una sobre-expresión de dicho receptor, caracterizado porque dicho kit o juego comprende los siguientes elementos:

a) un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, como se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 8, 11 a 18 y 24 a 30;

b) en forma opcional, los reactivos para la formación del medio favorable a la reacción inmunológica;

c) en forma opcional, los reactivos que permiten la demostración de complejos R-híbrido/anticuerpo y, en forma opcional, complejos EGFR/anticuerpo producidos por la reacción inmunológica.

58. Un kit o juego para llevar a cabo un método de diagnóstico de enfermedades inducidas por una sobre-expresión o una subexpresión de ambos, el R-híbrido y el IGF-IR y, en forma opcional, EGFR, o para llevar a cabo un proceso para la detección y/o la cuantificación de una sobre-expresión o de una subexpresión de ambos, el R-híbrido y IGF-IR y, en forma opcional, EGFR, en una muestra biológica, preferiblemente una sobre-expresión de dichos receptores, caracterizado porque dicho kit o juego comprende los siguientes elementos:

a) un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, como se reivindica en la reivindicación 2 y en una de las reivindicaciones 3 a 8, 11 a 18 y 24 a 30, si dependiente de la reivindicación 2;

b) en forma opcional, los reactivos para la formación del medio favorable a la reacción inmunológica;

c) en forma opcional, los reactivos que permiten la demostración de complejos R-híbrido/IGF-IR/anticuerpo y, en forma opcional, complejos EGFR/anticuerpo producidos por la reacción inmunológica.

59. El uso de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, como se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 8, 11 a 18 y 24 a 30, para la preparación de un medicamento destinado para el direccionamiento específico de un compuesto biológicamente activo a células que expresan o sobre-expresan el R-híbrido y, en forma opcional, EGFR.

60. El uso de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos funcionales, como se reivindica en la reivindicación 2 y en una de las reivindicaciones 3 a 8, 11 a 18 y 24 a 30, si dependiente de la reivindicación 2, para la preparación de un medicamento destinado al direccionamiento específico de un compuesto biológicamente activo a células que expresan o sobre-expresan el R-híbrido y IGF-IR y, en forma opcional, EGFR.

61. Un método de modular la actividad de R-híbrido en células mamíferas sensibles a R-híbrido, que comprende poner en contacto las

células con un anticuerpo, como se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 8, 11 a 18 y 24 a 30.

62. Un método de modular conjuntamente las actividades de IGF-IR y R-híbrido en células mamíferas sensibles a IGF-IR y R-híbrido, que comprende: poner en contacto las células con un anticuerpo, como se reivindica en la reivindicación 2 o en una de las reivindicaciones 3 a 8, 11 a 18 y 24 a 30, si dependiente de la reivindicación 2.

63. El método de la reivindicación 61 ó 62, en donde el anticuerpo modula la actividad de R-híbrido en células mamíferas seleccionadas del grupo conformado preferencialmente por células de cáncer de mama o células de cáncer de tiroides.

64. Un método de disminuir la actividad de R-híbrido en células mamíferas sensibles a R-híbrido, que comprende: poner en contacto las células con un anticuerpo, como se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 8, 11 a 18 y 24 a 30.

65. Un método de disminuir conjuntamente las actividades de IGF-IR y R-híbrido en células mamíferas sensibles a IGF-IR y R-híbrido, que comprende: poner en contacto las células con anticuerpo, como se reivindica en la reivindicación 2 o en una de las reivindicaciones 3 a 8, 11 a 18 y 24 a 30, si dependiente de la reivindicación, en una cantidad suficiente para disminuir la actividad de R-híbrido.

66. El método de la reivindicación 64 ó 65, en donde el anticuerpo disminuye la actividad de R-híbrido en células mamíferas seleccionadas del grupo conformado por, preferencialmente, células de cáncer de mama o células de cáncer de tiroides.

67. Un método de identificar un modulador de R-híbrido, que comprende:

a) poner en contacto el R-híbrido con el anticuerpo, como se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 8, 11 a 18 y 24 a 30;

b) poner en contacto el complejo de (a) con una biblioteca de compuestos;

c) identificar un compuesto que desestabiliza el complejo de (a); y

d) determinar si el compuesto exhibe actividad agonista o antagonista en el R-híbrido, en donde esta actividad indica identificación de un modulador de R-híbrido.

68. Un método de identificar un modulador de IGF-IR y R-híbrido, que comprende:

a) poner en contacto el IGF-IR y el R-híbrido con el anticuerpo, como se reivindica en la reivindicación 2 o en una de las reivindicaciones 3 a 8, 11 a 18 y 24 a 30, si dependiente de la reivindicación 2;

b) poner en contacto el complejo de (a) con una biblioteca de compuestos;

c) identificar un compuesto que desestabiliza el complejo de (a); y

d) determinar si el compuesto exhibe actividad agonista o antagonista en el IGF-IR y el R-híbrido, en donde esta actividad indica identificación de un modulador de IGF-IR y R-híbrido.

69. Un método de identificar un modulador de R-híbrido, que comprende:

a) cribar una biblioteca de secuencias de péptidos, en donde dicha biblioteca de secuencias de péptidos se une a R-híbrido, y en donde la biblioteca se deriva de una secuencia de péptidos que contiene por lo menos una secuencia seleccionada del grupo conformado por SEQ ID No. 2, 4, 6, 8, 10 y 12; y

b) determinar si la secuencia de aminoácidos aislada en (a) exhibe actividad agonista o antagonista en células sensibles a R-híbrido, seleccionadas del grupo conformado por estirpes celulares que presentan R-híbrido, tales como, por ejemplo, MDA-MB-231, MDA-MB-157, MDA-MB-468, MDA-MB-453 y ZR-75 para células de mama y BC-PAP para células de tiroides, en donde esta actividad indica identificación de un modulador de R-híbrido.

70. Un método de identificar un modulador de IGF-IR y R-híbrido, que comprende:

a) cribar una biblioteca de secuencias de péptidos, en donde dicha biblioteca de secuencias de péptidos se une a IGF-IR y/o R-híbrido, y en

donde la biblioteca se deriva de una secuencia de péptidos que contiene por lo menos una secuencia seleccionada del grupo conformado por SEQ ID No. 2, 4, 6, 8, 10 y 12; y

b) determinar si la secuencia de aminoácidos aislada en (a) exhibe actividad agonista o antagonista en células sensibles a IGF-IR y/o R-híbrido, seleccionadas del grupo conformado por estirpes celulares que presentan IGF-IR y/o R-híbrido, tales como, por ejemplo, MCF-7, T47D, BT20, ZR-75-1, MDA-MB-231, MDA-MB-157, MDA-MB-468, MDA-MB-453 y ZR-75 para células de mama, PC3 y DU145 para células de próstata, A549, A427 y SK- LU-1 para células de pulmón, HT29, Colo205 y CaCo-2 para células de colon, BC-PAP, FRO y ARO para células de tiroides, SK-OV-3 para células de ovarios, BxPC3, MiaPaCa-2 y LN36 para células de páncreas, SK-ES-1 para células renales y suprarrenales, de sarcoma, Daoy, TE-671 y D283 Med para células de meduloblastoma, MM-1S y MM-1R para células de mieloma múltiple, retinoblastoma y SK-MEL-28 para células de melanoma, en donde esta actividad indica identificación de un modulador de IGF-IR y R-híbrido.

71. Un método de determinar la regresión, evolución o iniciación de un trastorno patológico caracterizado por expresión incrementada y/o activación de R-híbrido humano, relativa a la normal, que comprende incubar una muestra obtenida de un paciente aquejado de dicho trastorno, con una sonda detectable que es específica para dicho R-híbrido humano, bajo condiciones que favorecen la formación de un complejo sonda/R-híbrido, cuya presencia es indicativa de la regresión, evolución o iniciación de dicho trastorno patológico en dicho paciente.

72. Un método de determinar la regresión, evolución o iniciación de un trastorno patológico caracterizado por expresión incrementada y/o activación de ambos, el IGF-IR y R-híbrido humanos, relativa a la normal, que comprende incubar una muestra obtenida de un paciente aquejado de dicho trastorno, con una sonda detectable que es específica para dichos IGF-IR y R-híbrido humanos, bajo condiciones que favorecen la formación de un complejo sonda/R-híbrido y complejo sonda/IGF-IR, cuya presencia

es indicativa de la regresión, evolución o iniciación de dicho trastorno patológico en dicho paciente.

73. El método de las reivindicaciones 71 y 72, en donde la sonda es un anticuerpo.

74. El método de la reivindicación 73, en donde dicho anticuerpo se marca con un marcador radioactivo, un marcador fluorescente o una enzima.

75. El método de la reivindicación 74, en donde dicho anticuerpo contiene el anticuerpo como se reivindica en las reivindicaciones 1 a 8, 11 a 18 y 24 a 30.

76. El método de detectar parejas de unión para el anticuerpo de la reivindicación 1 en una muestra, método que comprende:

a) incubar el anticuerpo, como se reivindica en una de las reivindicaciones 1 a 8, 11 a 18 y 24 a 30, con una muestra biológica obtenida de un paciente con un trastorno proliferativo celular, caracterizado por un nivel anormal de expresión y/o activación de R-híbrido humano, bajo condiciones suficientes para permitir unión específica del anticuerpo a su pareja de unión, y

b) detectar unión específica, en donde unión específica indica la presencia de una pareja de unión en la muestra.

77. El método de detectar contrapartes de unión para el anticuerpo de la reivindicación 2 en una muestra, método que comprende:

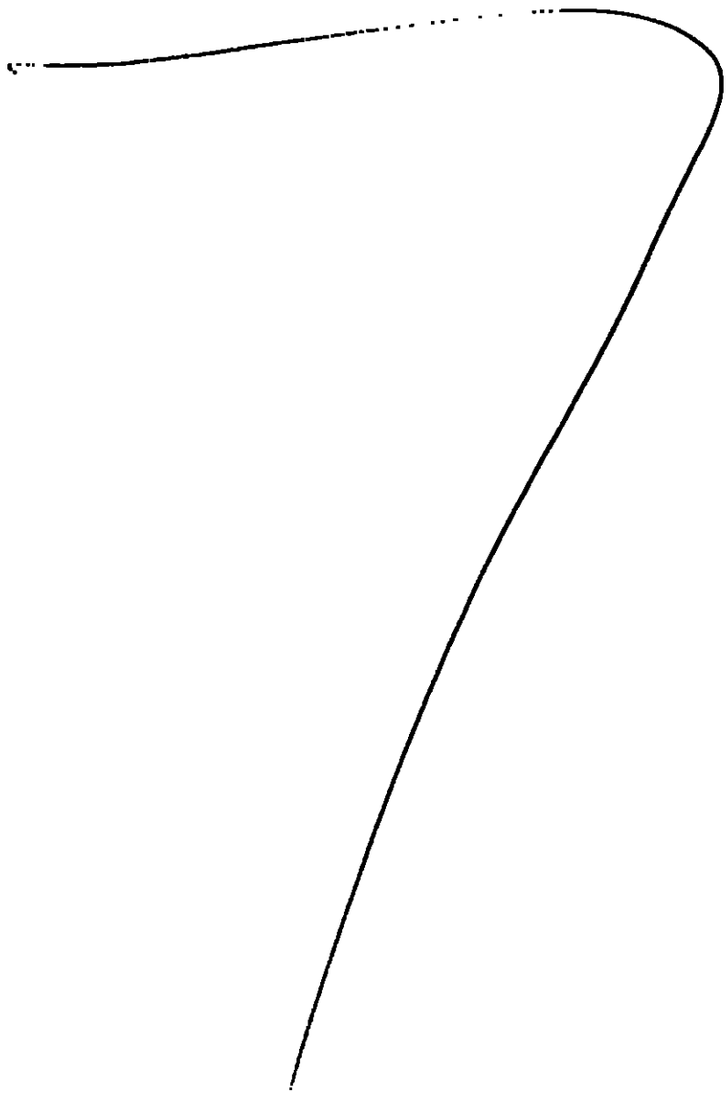
a) incubar el anticuerpo, como se reivindica en la reivindicación 2 o en una de las reivindicaciones 3 a 8, 11 a 18 y 24 a 30, si dependiente de la reivindicación 2, con una muestra biológica obtenida de un paciente con un trastorno proliferativo celular, caracterizado por un nivel anormal de expresión y/o activación de ambos, el IGF-1R y el R-híbrido humanos, bajo condiciones suficientes para permitir unión específica del anticuerpo a su pareja de unión, y

b) detectar unión específica, en donde unión específica indica la presencia de una pareja de unión en la muestra.

78. Un método de purificar un R-híbrido de una muestra, método que comprende:

a) incubar el anticuerpo, como se reivindica en la reivindicaciones 1 a 8, 11 a 18 y 24 a 30, con una muestra bajo condiciones que permitan unión específica del anticuerpo y el receptor; y

b) separar el anticuerpo de la muestra y obtener el receptor purificado.



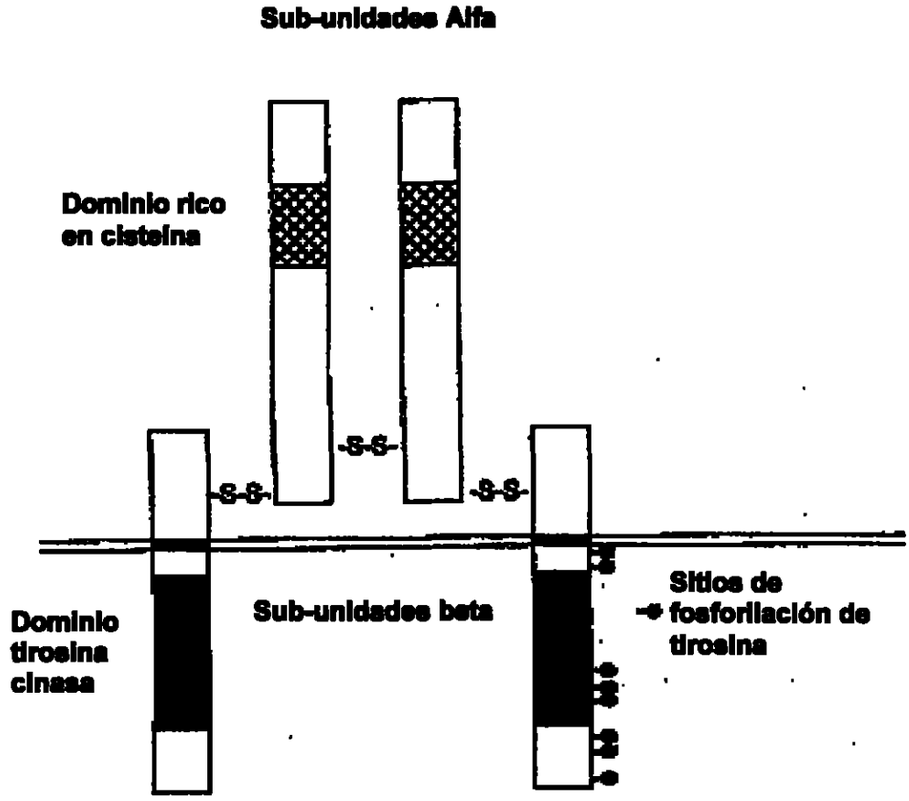

Sub-unidades Alfa
Dominio rico en cisteína
-S-S-
-S-S-
-S-S-
Dominio tirosina cinasa
Sub-unidades beta
Sitios de fosforilación de tirosina

FIGURA 1

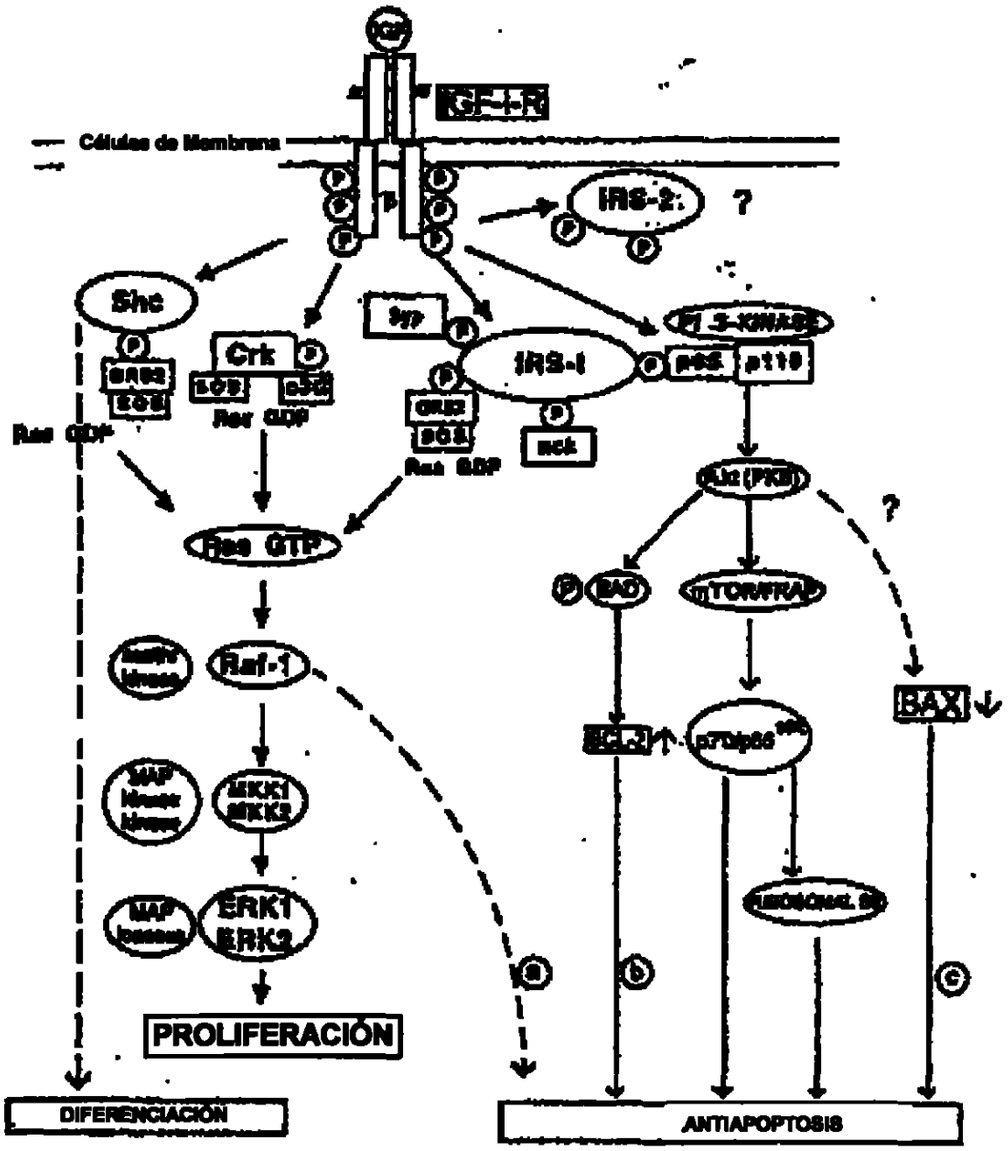

IGF-I-R
Células de Membrana
IRS-2
?
Shc
Crk
Ras GDP
IRS-1
nck
Ras GDP
Ras GTP
Raf-1
MEKK1
MKK3
ERK1
ERK2
PROLIFERACIÓN
DIFERENCIACIÓN
BAD
mTOR/FRAP
BAX
ANTIAPOPTOSIS

FIGURA 2

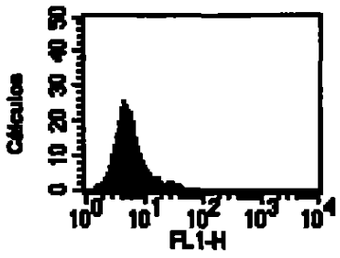


FIGURA 3A

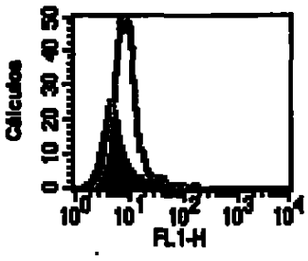


FIGURA 3B

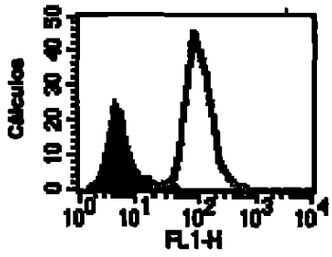
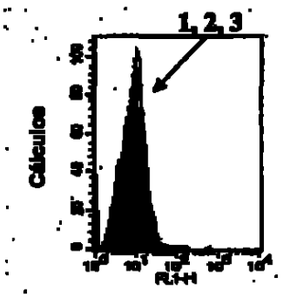
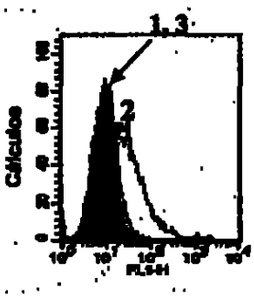


FIGURA 3C



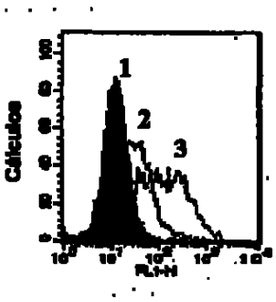
Células transfectadas

FIGURA 4A



IGF+IR+ células

FIGURA 4B



IR+ células

FIGURA 4C

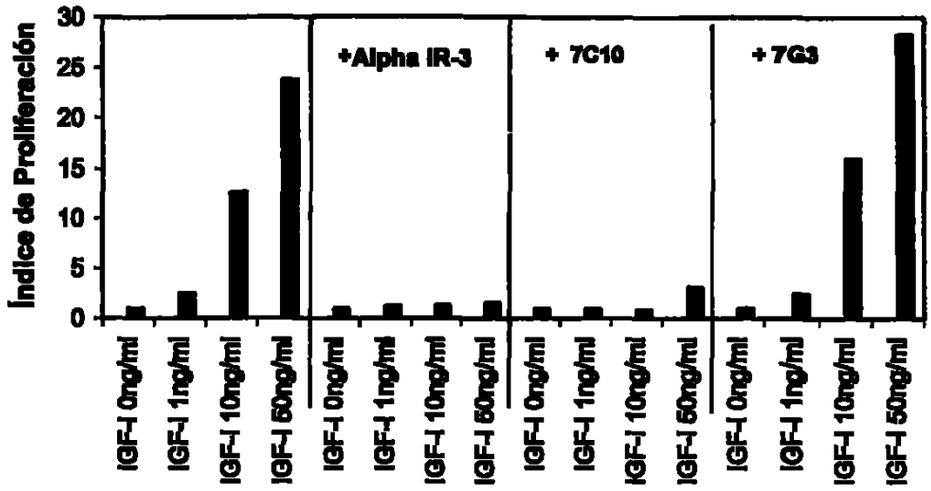


FIGURA 5

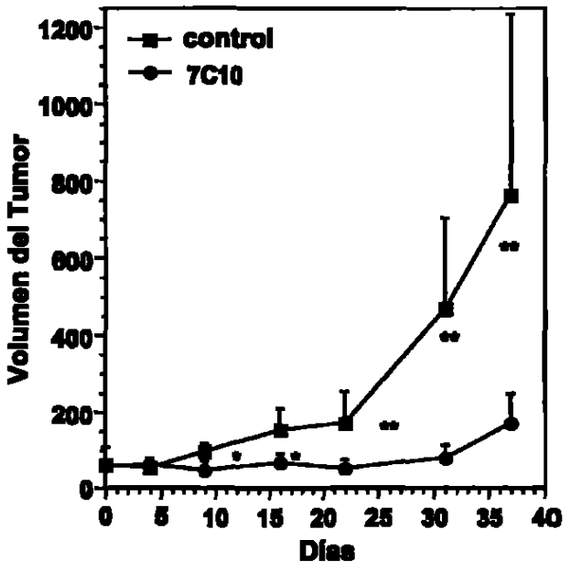


FIGURA 6A

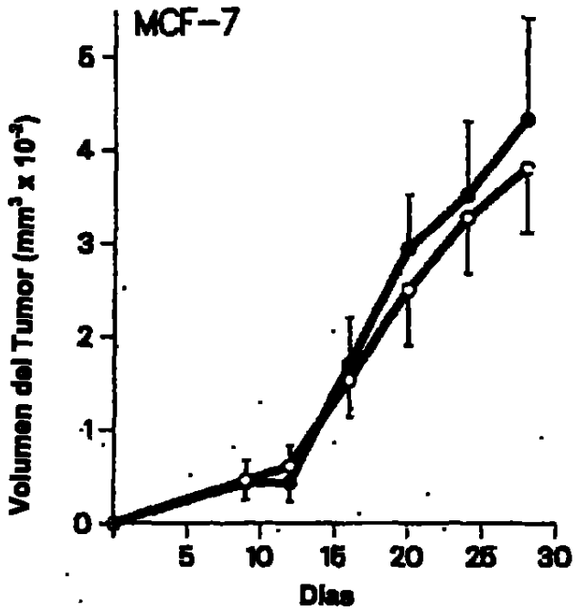


FIGURA 6B

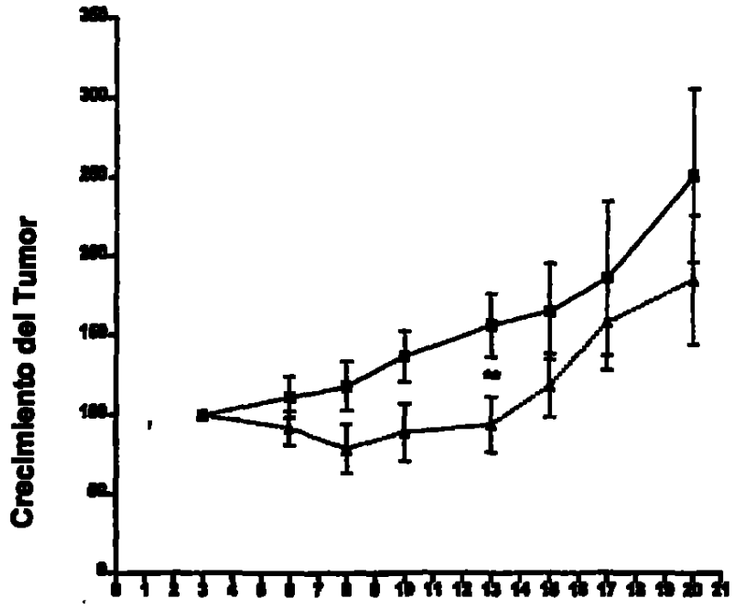


FIGURA 6C

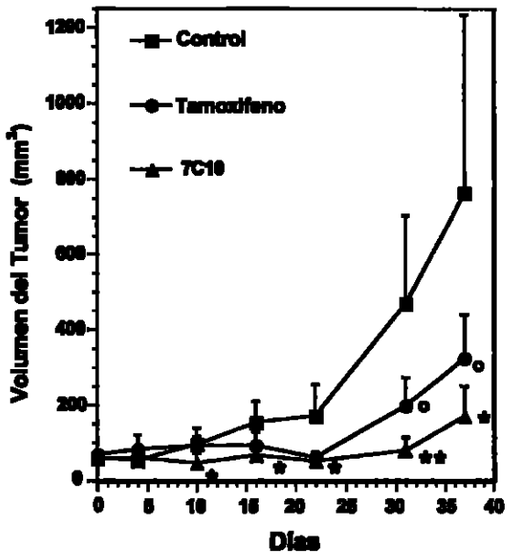


FIGURA 7

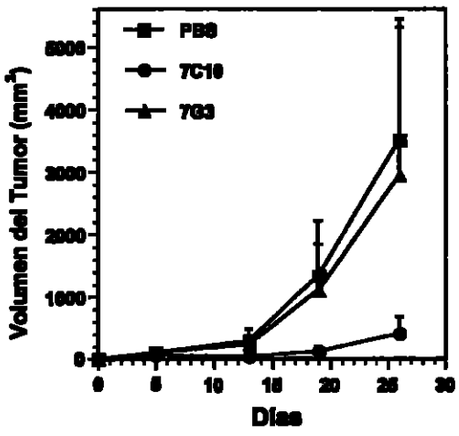


FIGURA 8A

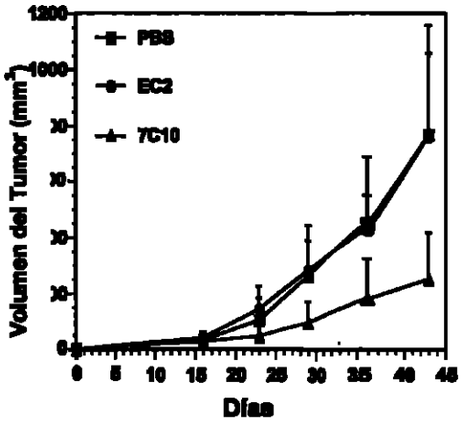


FIGURA 8B

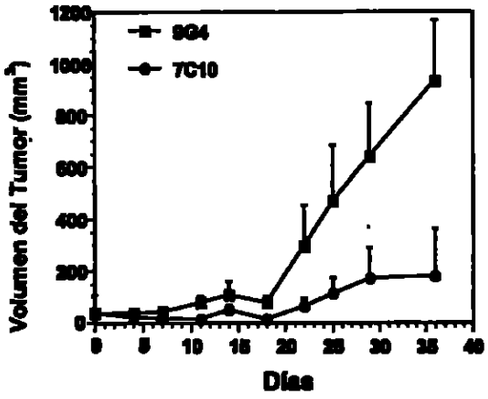


FIGURA 8C

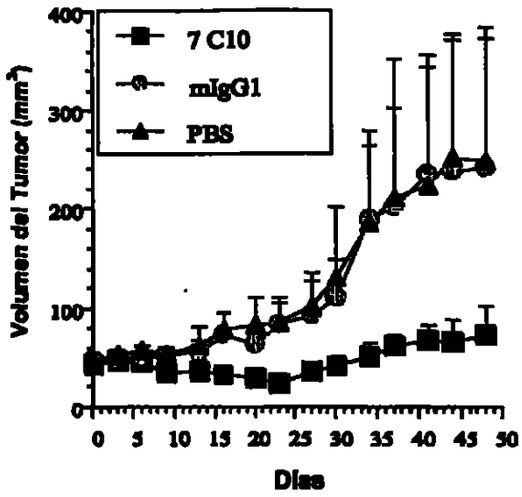


FIGURA 8D

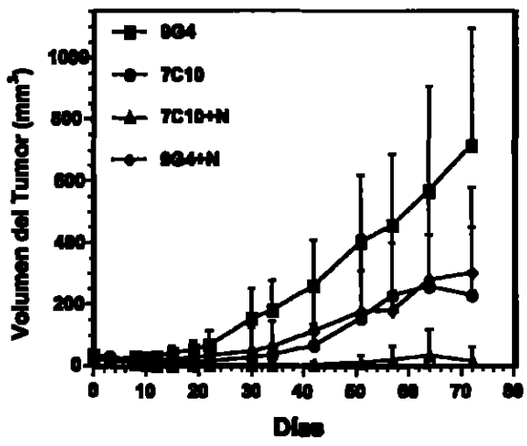


FIGURA 9

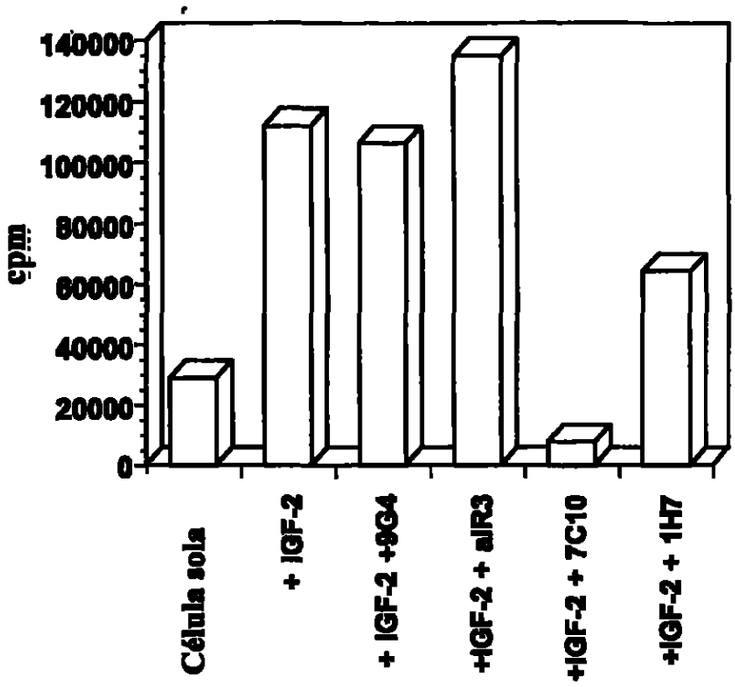


FIGURA 10

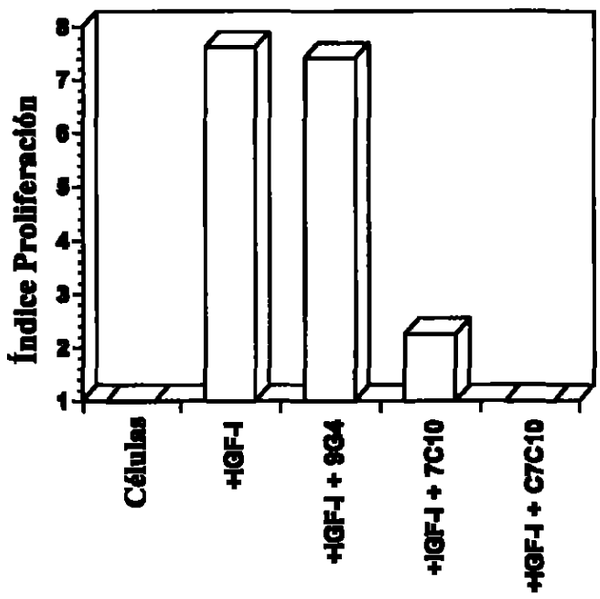


FIGURA 11

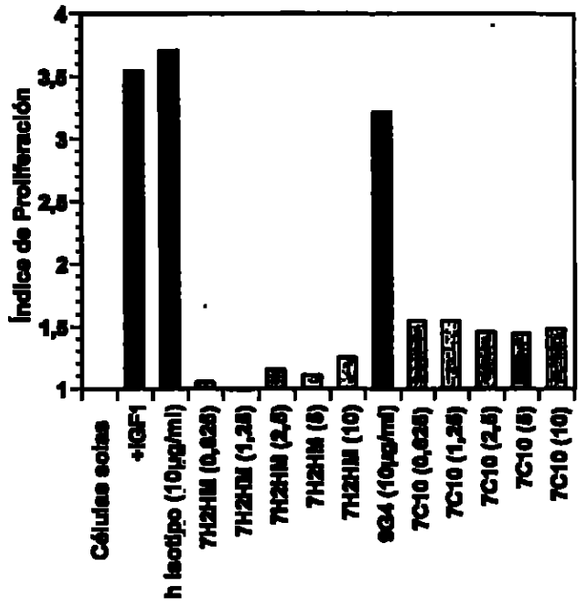


FIGURA 12

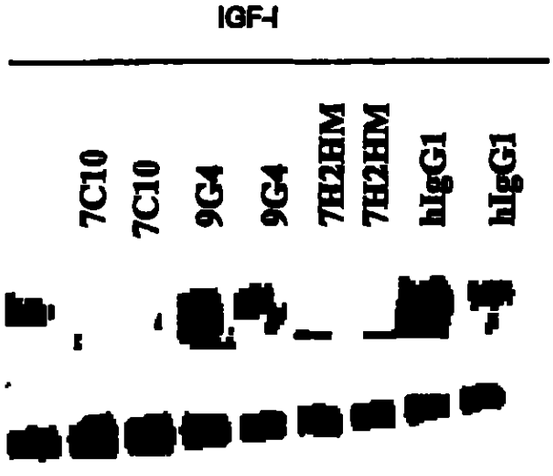


FIGURA 13

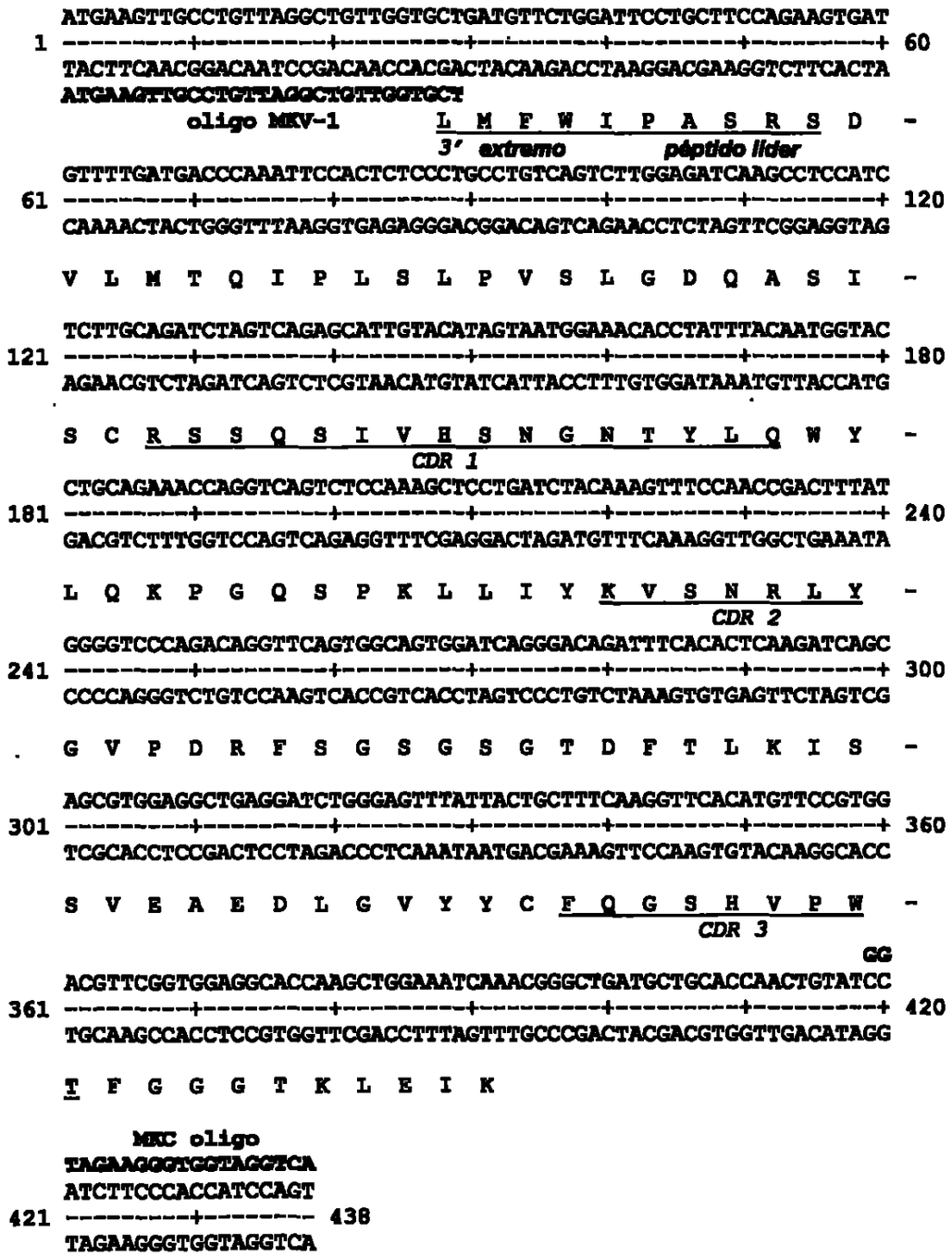

oligo MKV-1
L M F W I P A S R S D -
3' extremo
péptido líder
V L M T Q I P L S L P V S L G D Q A S I -
S C R S S Q S I V H S N G N T Y L Q W Y -
CDR 1
L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R L Y -
CDR 2
G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S -
S V E A E D L G V Y Y C F Q G S H V P W -
CDR 3
GG
T F G G G T K L E I K
MKC oligo
TAGAAGGGTGGTAGGTCA
ATCTTCCCACCATCCAGT
TAGAAGGGTGGTAGGTCA
1
60
61
120
121
180
181
240
241
300
301
360
361
420
438

FIGURA 14

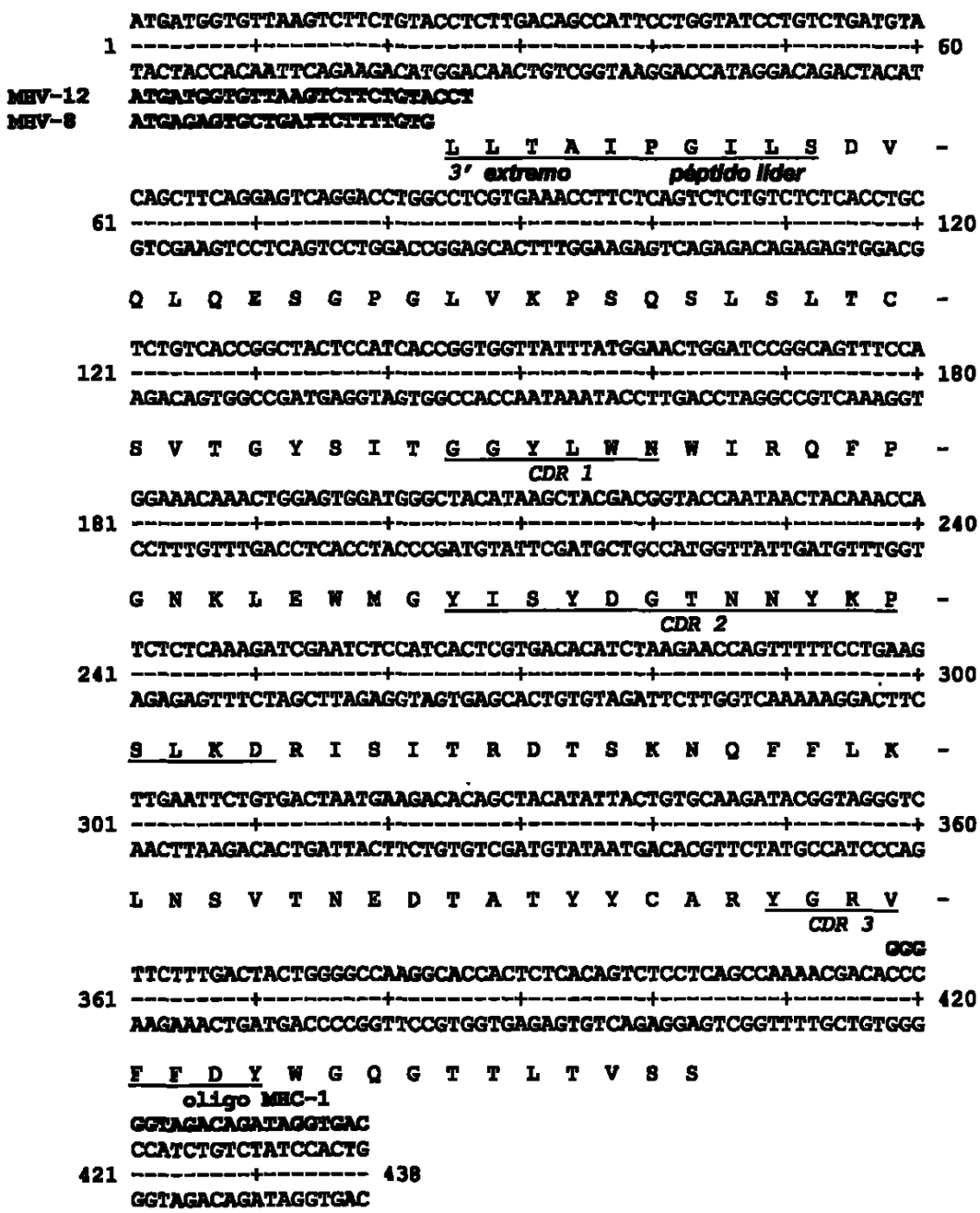

ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCTCTTGACAGCCATTCCTGGTATCCTGTCTGATGTA
TACTACCACAATTCAGAAGACATGGACAACTGTCGGTAAGGACCATAGGACAGACTACAT
MHV-12 ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCT
MHV-8 ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG
L L T A I P G I L S D V -
3' extremo
péptido líder
CAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTCGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCTCTCACCTGC
GTCGAAGTCCTCAGTCCTGGACCGGAGCACTTTGGAAGAGTCAGAGACAGAGAGTGGACG
Q L Q E S G P G L V K P S Q S L S L T C -
TCTGTCACCGGCTACTCCATCACCGGTGGTTATTTATGGAACTGGATCCGGCAGTTTCCA
AGACAGTGGCCGATGAGGTAGTGGCCACCAATAAATACCTTGACCTAGGCCGTCAAAGGT
S V T G Y S I T G G Y L W N W I R Q F P -
CDR 1
GGAAACAAACTGGAGTGGATGGGCTACATAAGCTACGACGGTACCAATAACTACAAACCA
CCTTTGTTTGACCTCACCTACCCGATGTATTCGATGCTGCCATGGTTATTGATGTTTGGT
G N K L E W M G Y I S Y D G T N N Y K P -
CDR 2
TCTCTCAAAGATCGAATCTCCATCACTCGTGACACATCTAAGAACCAGTTTTTCCTGAAG
AGAGAGTTTCTAGCTTAGAGGTAGTGAGCACTGTGTAGATTCTTGGTCAAAAAGGACTTC
S L K D R I S I T R D T S K N Q F F L K -
TTGAATTCTGTGACTAATGAAGACACAGCTACATATTACTGTGCAAGATACGGTAGGGTC
AACTTAAGACACTGATTACTTCTGTGTCGATGTATAATGACACGTTCTATGCCATCCCAG
L N S V T N E D T A T Y Y C A R Y G R V -
CDR 3
GGG
TTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCC
AAGAAACTGATGACCCCGGTTCCGTGGTGAGAGTGTCAGAGGAGTCGGTTTTGCTGTGGG
F F D Y W G Q G T T L T V S S
oligo MHC-1
GGTAGACAGATAGGTGAC
CCATCTGTCTATCCACTG
421 438
GGTAGACAGATAGGTGAC

FIGURA 15

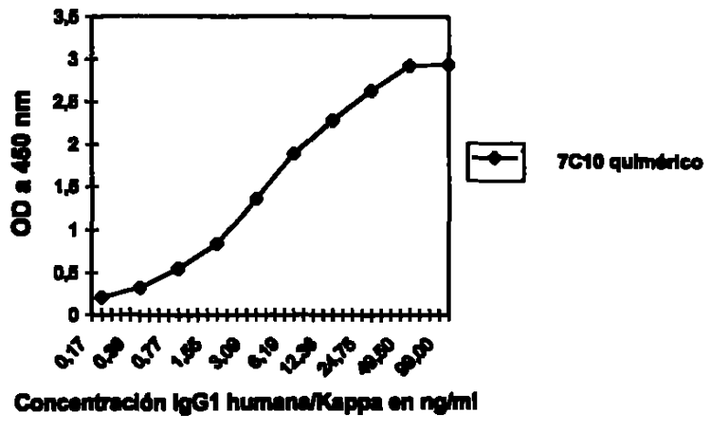


FIGURA 16

```
                    3   7                                    CDR 1
7C10 VL mouse DVLMTQIPLSLPVSLGDQASISC RSSQSIVHSNGNTYLQ
DRB1-4.3       ......T..............  ..............E
C94-5B11'CL    ......T..............  ..............E
Kabat sgII mouse..V...T..............  .....L.........E

                                  CDR 2
7C10 VL mouse WYLQKPGQSPKLLIY KVSNRLY GVPDRFSGSGSGTDFTL
DRB1-4.3       ..............  .....FS ..................
C94-5B11'CL    ..............  .....FS ..................
Kabat sgII mouse ............  .....FS ..................

                   77                  CDR 3
7C10 VL mouse KISSVEAEDLGVYYC FQGSHVPWT FGGGTKLEIK
DRB1-4.3       ...R..........  .......F. ..S....D..
C94-5B11'CL    ...R..........  ..........  ..........
Kabat sgII mouse ...R..........  ...T...Y. ..........
```

FIGURA 17

```
                                                    CDR 1
7C10 VL mouse DVLMTQIPLSLPVSLGDQASISC RSSQSIVHSNGNTYLQ
GM607          .IV...S......TP.EP..... .....LL....YN..D
DPK15/A19      .IV...S......TP.EP..... .....LL....YN..D
Kabat sgII hu  .IV...S......TP.EP..... .....LL..D.XX..X

                                  CDR 2
7C10 VL mouse WYLQKPGQSPKLLIY KVSNRLY GVPDRFSGSGSGTDFTLK
GM607          ..........Q.... LG...AS ..................
DPK15/A19      ..........Q.... LG...AS ..................
Kabat sgII hu  ..........Q.... L....AS ..................

                                  CDR 3
7C10 VL mouse  ISSVEAEDLGVYYC FQGSHVPWT FGGGTKLEIK
GM607          ..R.....V..... M.ALQT.Q. ..Q...V...
DPK15/A19      ..R.....V..... M.ALQT.
Kabat sgII hu  ..R.....V..... M.ALQX.R. ..Q...V...
```

FIGURA 18

```
                                                    CDR 1
7C10 VL mouse        DVLMTQIPLSLPVSLGDQASISC RSSQSIVHSNGNTYLQ
GM 607               .IV...S......TP.EP..... .....LL....YN..D
7C10 VL Humanized 1  ..V...S......TP.EP..... .................
7C10 VL Humanized 2  .IV...S......TP.EP..... .................

                                  CDR 2
7C10 VL mouse        WYLQKPGQSPKLLIY KVSNRLY GVPDRFSGSGSGTDFTL
GM 607               ..........Q.... LG...AS ..................
7C10 VL Humanized 1  ..........Q.... ....... ..................
7C10 VL Humanized 2  ..........Q.... ....... ..................

                                  CDR 3
7C10 VL mouse         KISSVEAEDLGVYYC FQGSHVPWT FGGGTKLEIK
GM 607                ...R.....V..... M.ALQT.Q. ..Q...V...
7C10 VL Humanized 1   ...R.....V..... ......... ..Q...V...
7C10 VL Humanized 2   ...R.....V..... ......... ..Q...V...
```

FIGURA 19

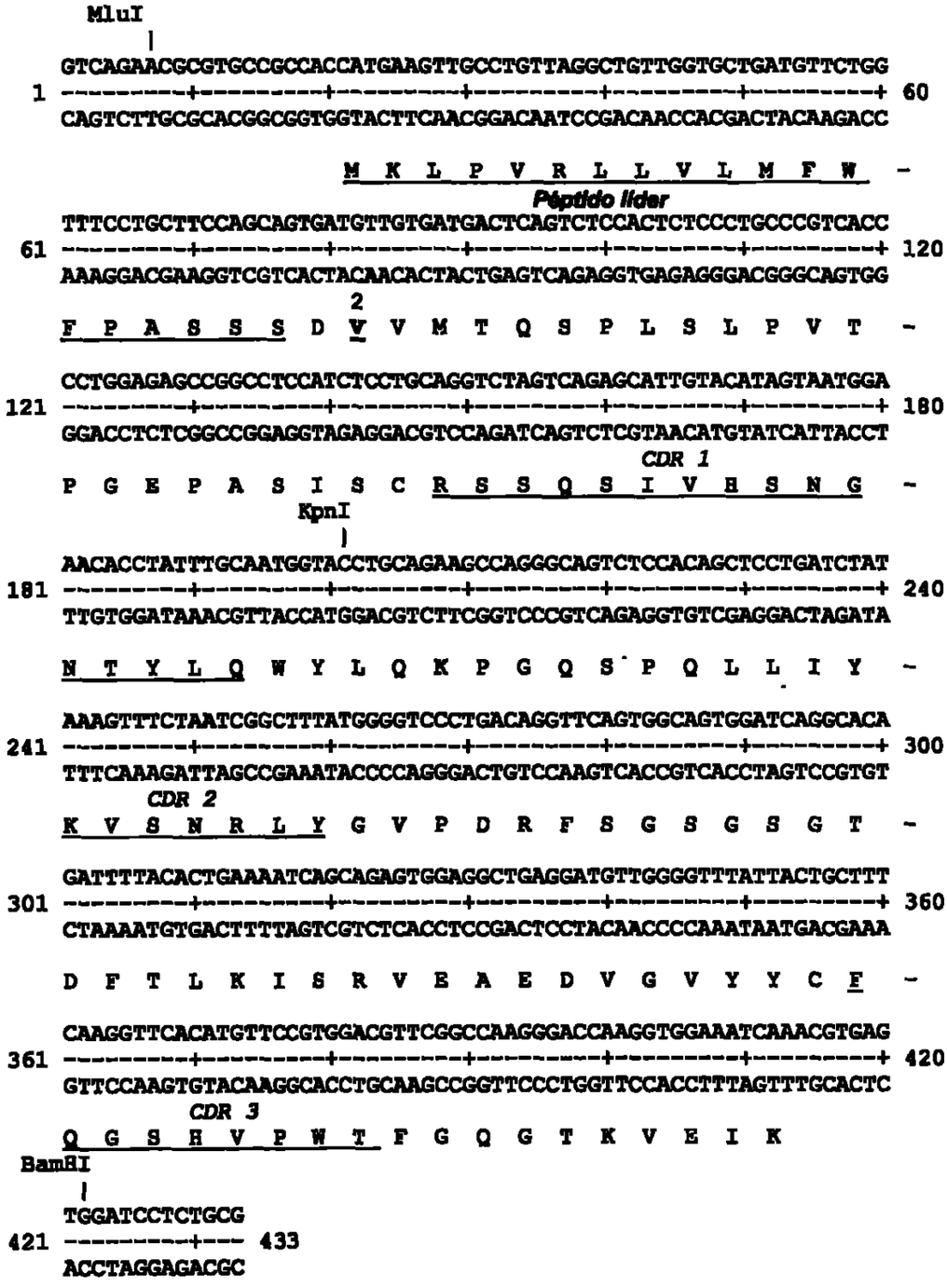

MluI
M K L P V R L L V L M F W -
Péptido líder
2
F P A S S S D V V M T Q S P L S L P V T -
CDR 1
P G E P A S I S C R S S Q S I V H S N G -
KpnI
N T Y L Q W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y -
CDR 2
K V S N R L Y G V P D R F S G S G S G T -
D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F -
CDR 3
Q G S H V P W T F G Q G T K V E I K
BamHI
TGGATCCTCTGCG
ACCTAGGAGACGC
433

FIGURA 20

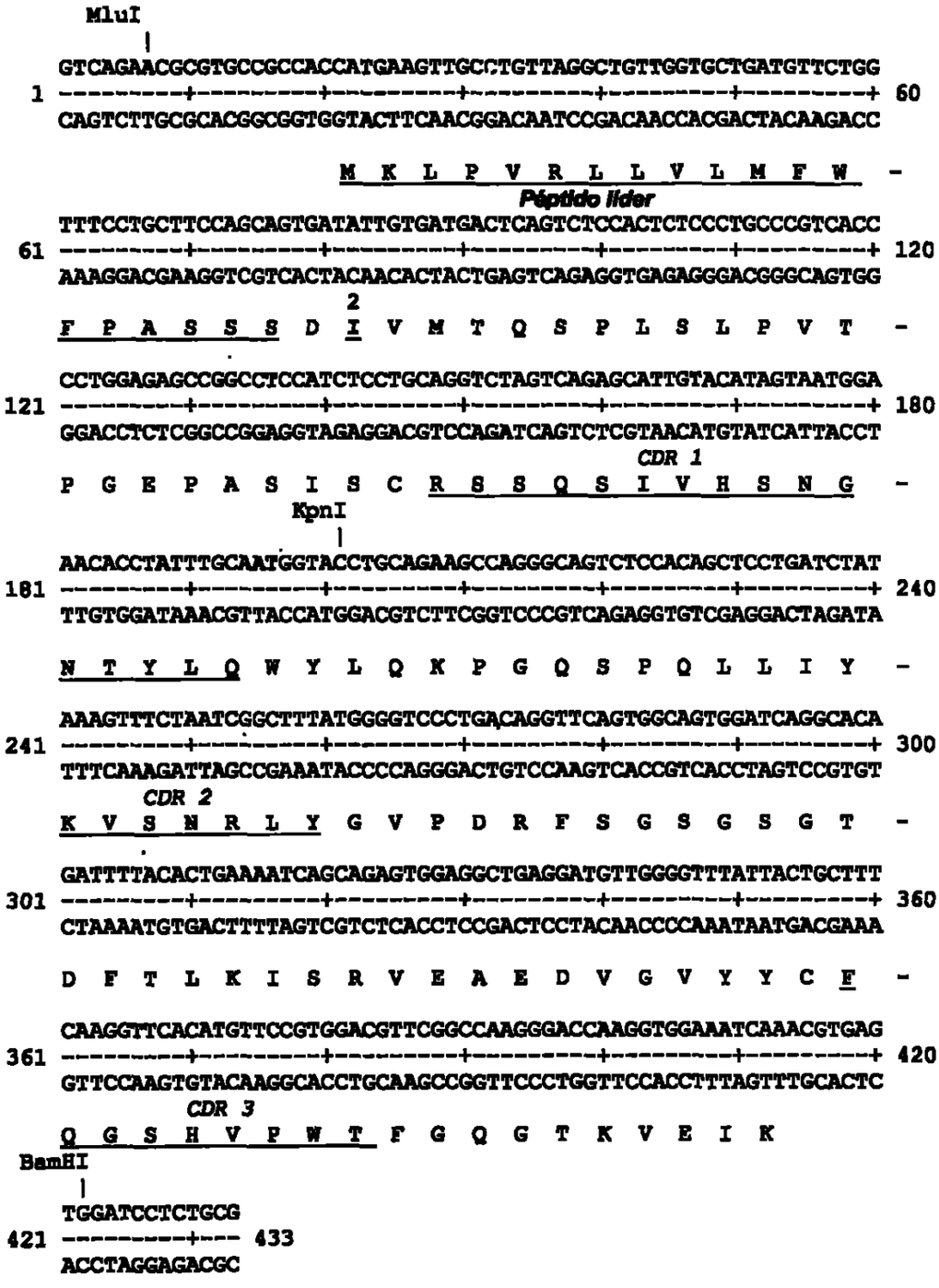

MluI
M K L P V R L L V L M F W
Péptido líder
F P A S S S D I V M T Q S P L S L P V T
CDR 1
P G E P A S I S C R S S Q S I V H S N G
KpnI
N T Y L Q W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y
CDR 2
K V S N R L Y G V P D R F S G S G S G T
D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F
CDR 3
Q G S H V P W T F G Q G T K V E I K
BamHI

FIGURA 21

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

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

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

FIGURA 22

```
                          Rch 1                30  CDR 1 Rch 2
7C10 VH mouse     DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSIT GGYLWN WIRQ
human Kabat sgII  Q..............T.....T.S.G.VS SYWS.. ....
human VH FUR1'CL  Q..............ET.....T.S....S S..Y.S ....
human Germline    Q..............ET.....T.S....S S..Y.S ....

                  Rch 2  48       CDR 2       67  71  Rch 3
7C10 VH mouse     FPGNKLEWMG YISYDGTNNYKPSLKD RISITRDTSKNQFFL
human Kabat sgII  P..KG...I. R.Y.S.STX.N....S .VT.SV.......S.
human VH FUR1'CL  P..KG...I. SMTHS.SSY.N....S .VT.SV.......S.
human Germ-line   P..KG...I. S.YHS.STY.N....S .VT.SV.......S.

                      Rch 3              CDR 3        Rch 4
7C10 VH mouse     KLNSVTNEDTATYYCAR YGRVFFDY        WGQGTTLTVSS
human Kabat sgII  ..S...AA...V..... ELPGGYDV        .....LV....
human VH FUR1'CL  Q.R...AA...V..... GRYCSSTSCNWFDP .....LV....
human Germline    ..S...AA...V.....
```

FIGURA 23

446

	30 CDR 1 48
7C10 VH mouse	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSIT GGYLWN WIRQFPGNKLEWMG
human germline	Q.....ET.....T.S....S S..Y.G ....P..KG...I.
VH Humanized 1	Q.....ET.....T.S..... ....P..KG.....
VH Humanized 2	Q.....ET.....T.S..... ....P..KG...I.
VH Humanized 3	Q.....ET.....T.S....S ....P..KG...I.

	CDR 2 67 71
7C10 VH mouse	YISYDGTNNYKPSLKD RISITRDTSKNQFFLKLNSVTNEDTATYYCAR
human germline	S.FHS.SSY.N....S .VT.SV.....S...S...AA...V.....
VH Humanized 1	....T.S.....S...S...AA...V.....
VH Humanized 2	..... .VT.S.....S...S...AA...V.....
VH Humanized 3	..... .VT.SV.....S...S...AA...V.....

	CDR 3
7C10 VH mouse	YGRVFFDY WGQGTTLTVSS
human germline	
VH Humanized 1	....LV....
VH Humanized 2	....LV....
VH Humanized 3	....LV....

FIGURA 24

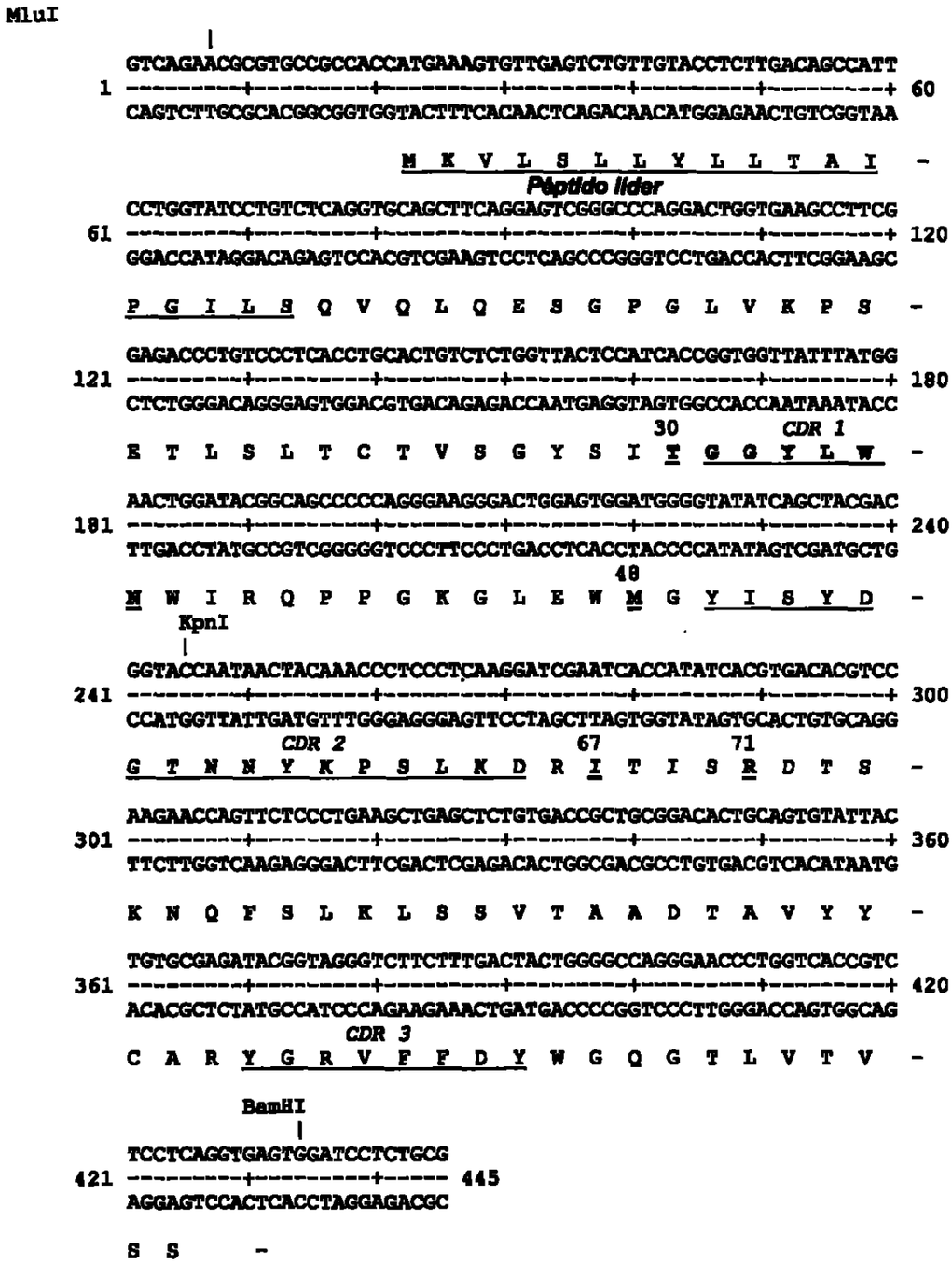

MluI
M K V L S L L Y L L T A I
Péptido líder
P G I L S Q V Q L Q E S G P G L V K P S
E T L S L T C T V S G Y S I T G G Y L W
CDR 1
30
M W I R Q P P G K G L E W M G Y I S Y D
48
KpnI
G T N N Y K P S L K D R I T I S R D T S
CDR 2
67
71
K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y
C A R Y G R V F F D Y W G Q G T L V T V
CDR 3
BamHI
S S
1
60
61
120
121
180
181
240
241
300
301
360
361
420
421
445

FIGURA 25

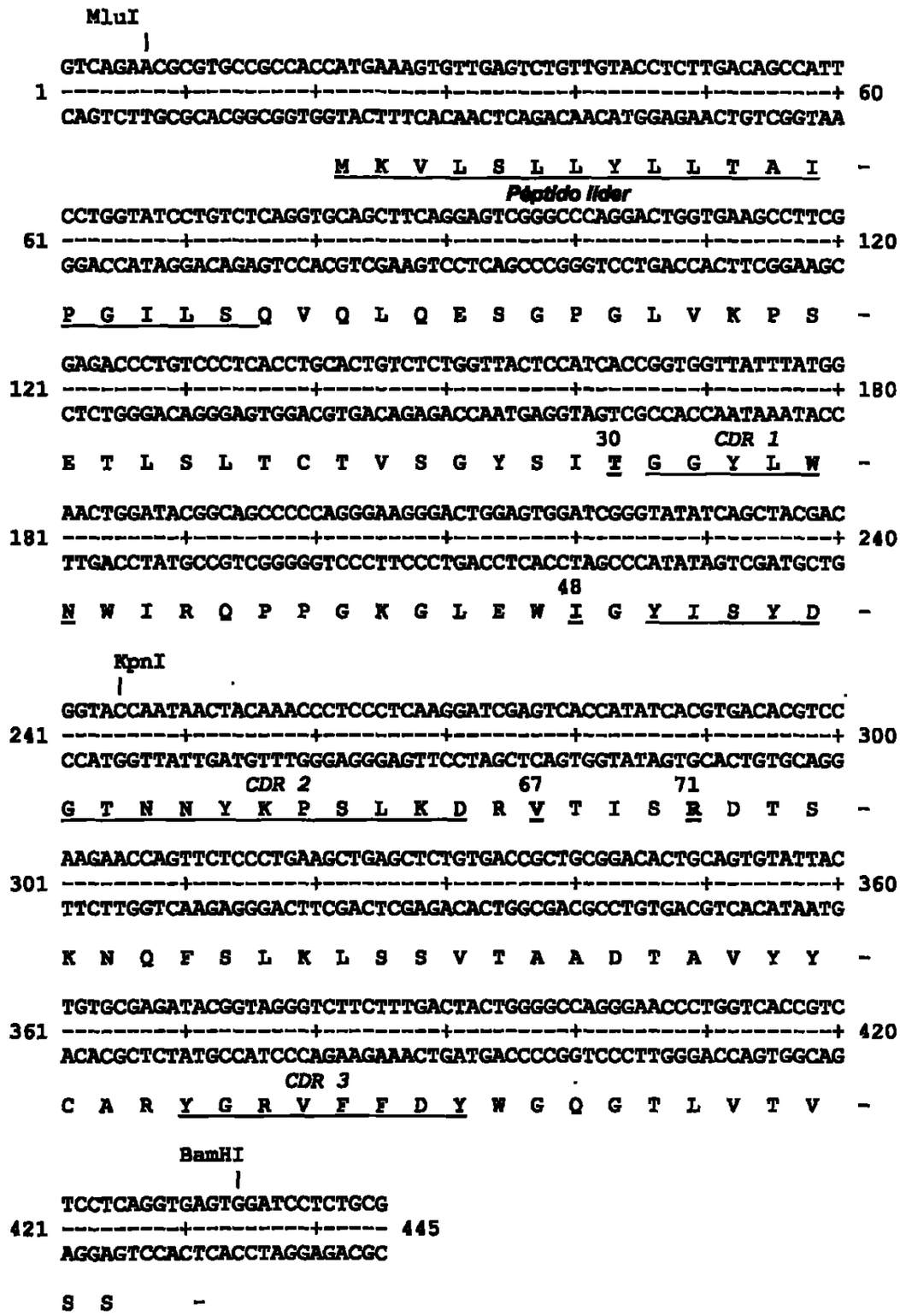

MluI
M K V L S L L Y L L T A I -
Péptido líder
P G I L S Q V Q L Q E S G P G L V K P S -
30
CDR 1
E T L S L T C T V S G Y S I T G G Y L W -
48
N W I R Q P P G K G L E W I G Y I S Y D -
KpnI
CDR 2
67
71
G T N N Y K P S L K D R V T I S R D T S -
CDR 3
C A R Y G R V F F D Y W G Q G T L V T V -
BamHI
S S -

FIGURA 26

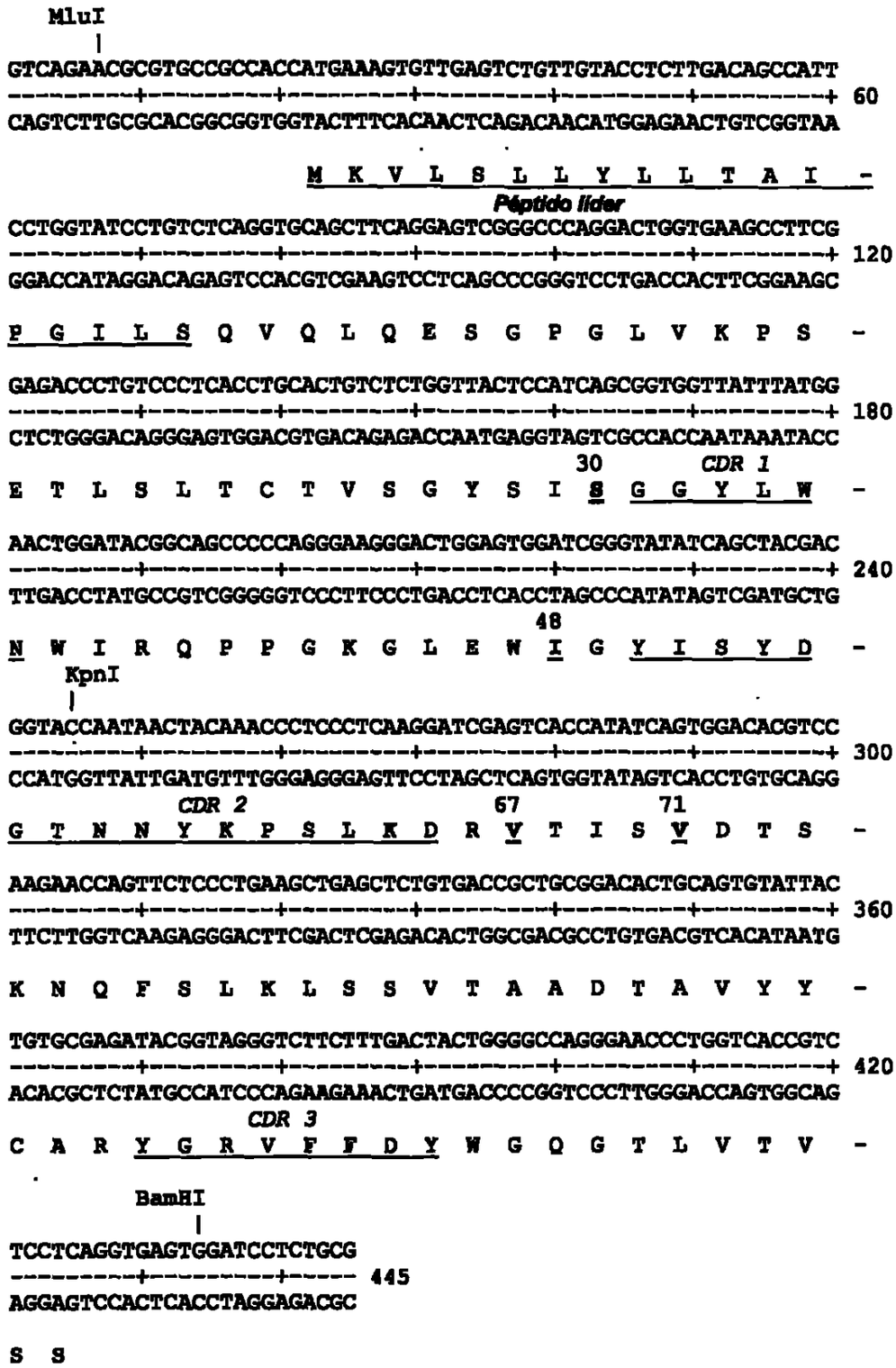

MluI
M K V L S L L Y L L T A I -
Péptido líder
P G I L S Q V Q L Q E S G P G L V K P S -
30
CDR 1
E T L S L T C T V S G Y S I S G G Y L W -
48
N W I R Q P P G K G L E W I G Y I S Y D -
KpnI
CDR 2
67
71
G T N N Y K P S L K D R V T I S V D T S -
K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y -
CDR 3
C A R Y G R V F F D Y W G Q G T L V T V -
BamHI
S S

FIGURA 27

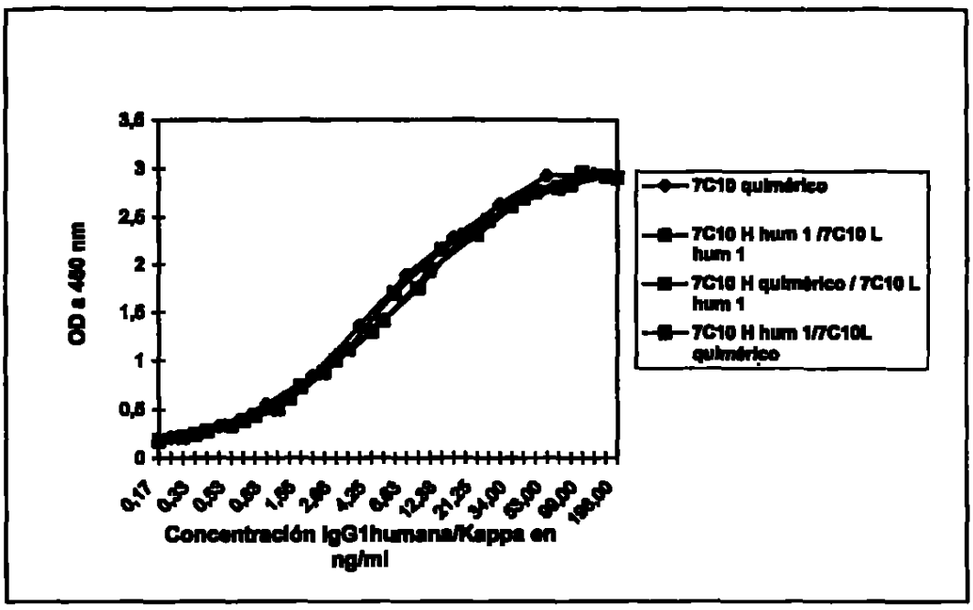


FIGURA 28

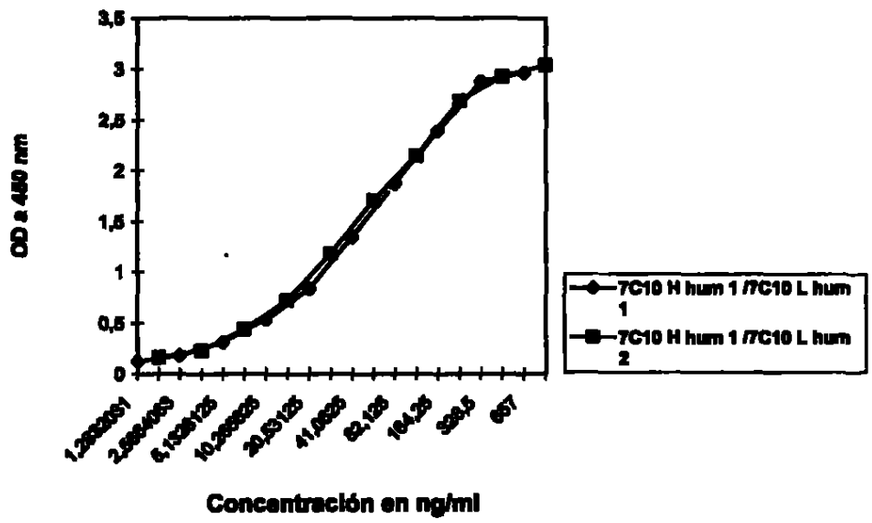


FIGURA 29

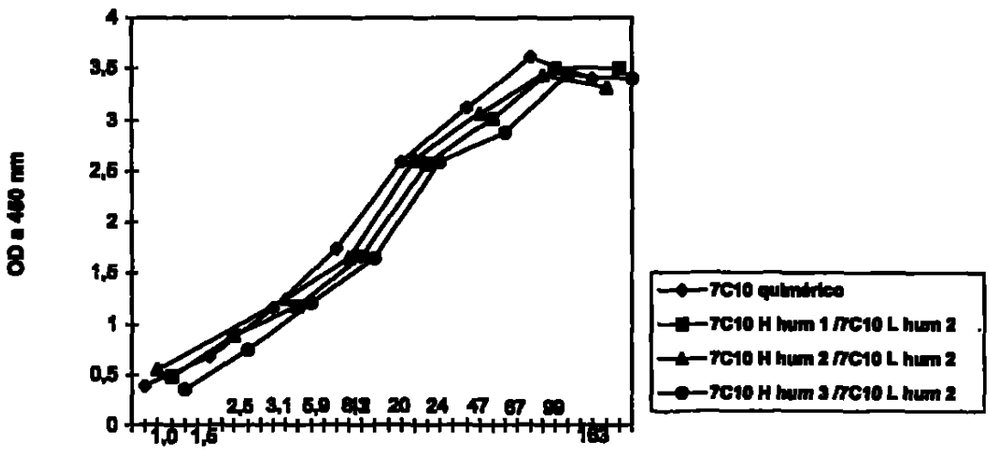


FIGURA 30

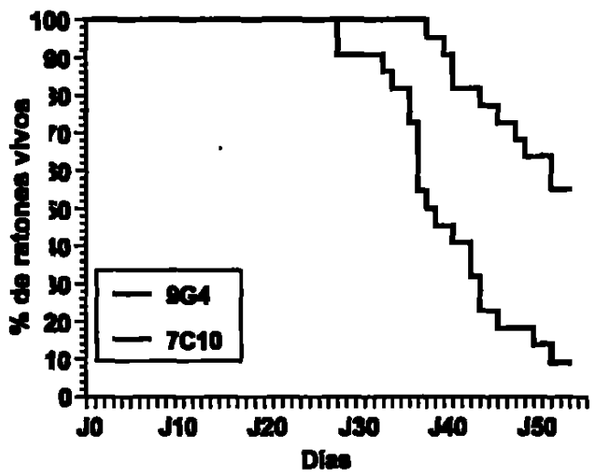


FIGURA 31

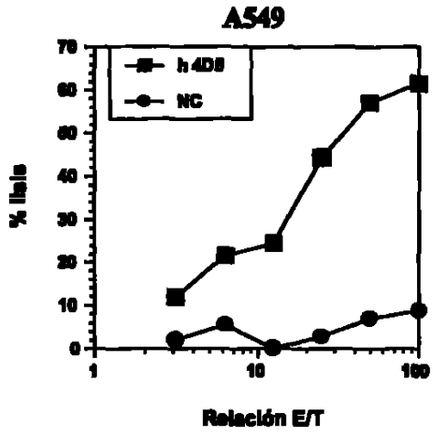


FIGURA 32A

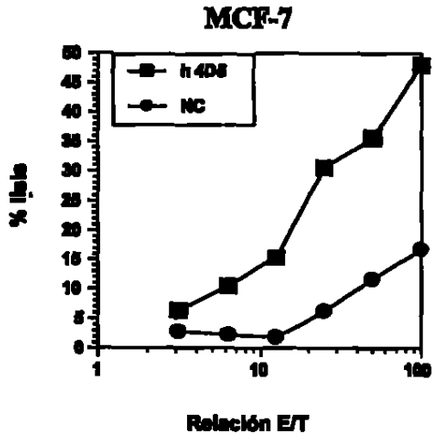


FIGURA 32B

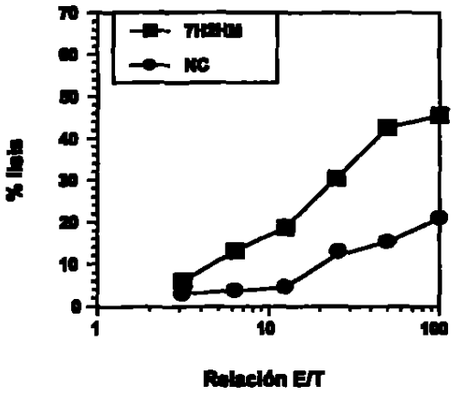


FIGURA 32C

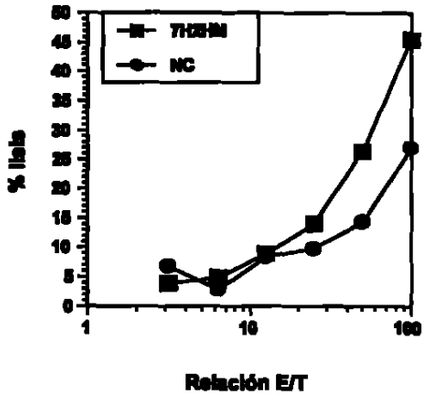


FIGURA 32D

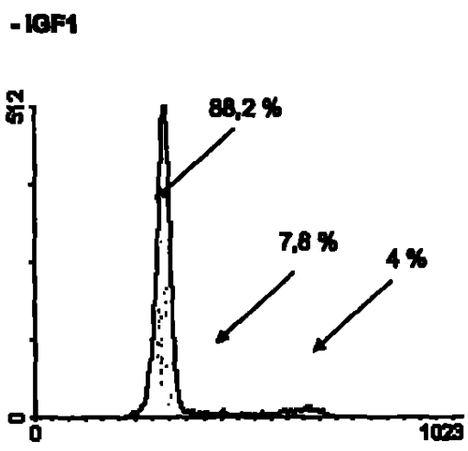


FIGURA 33A

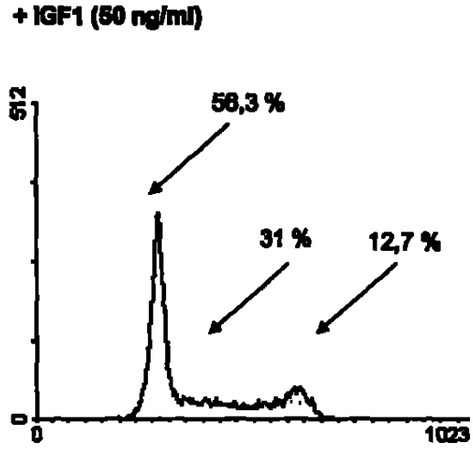


FIGURA 33B

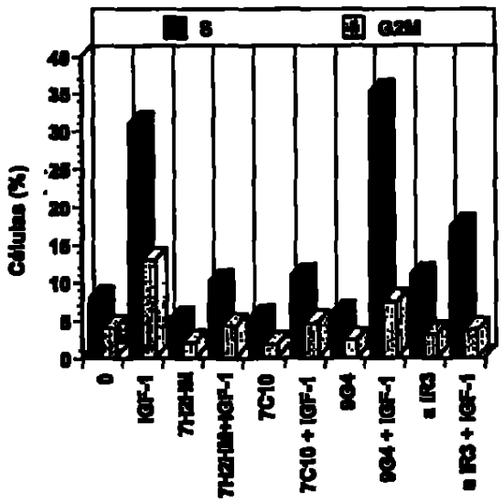


FIGURA 33C

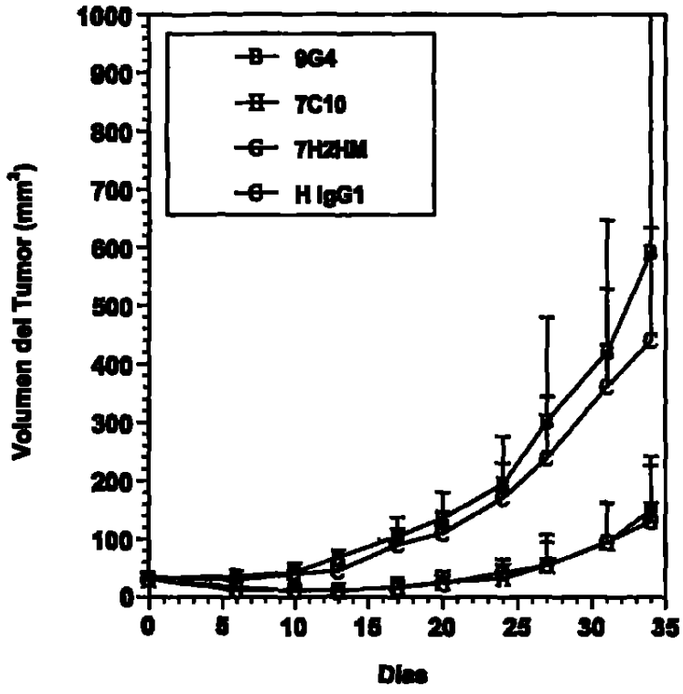


FIGURA 34A

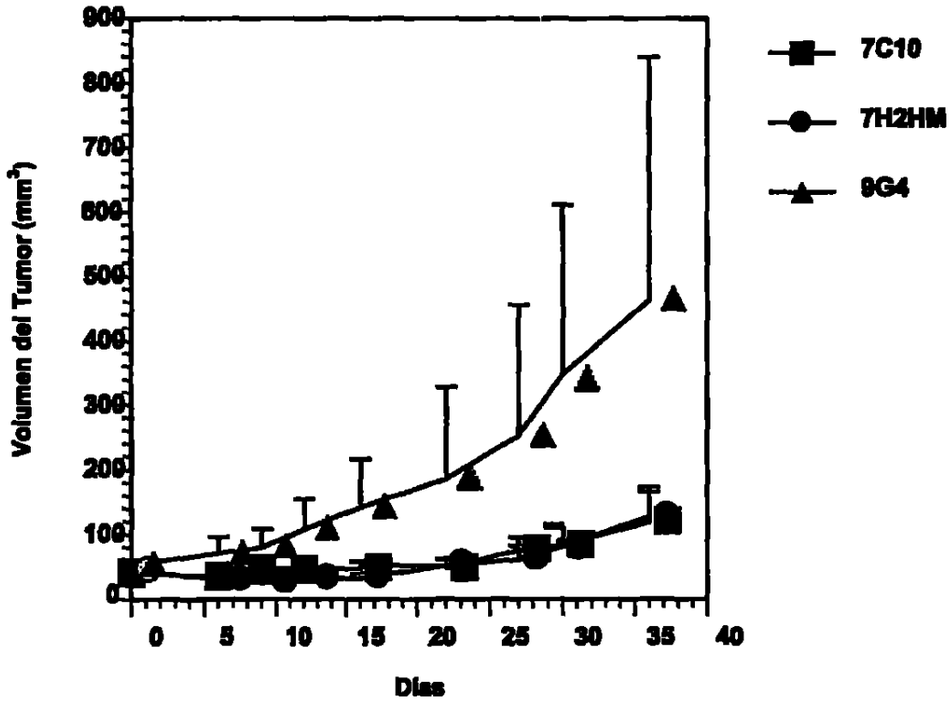


FIGURA 3B

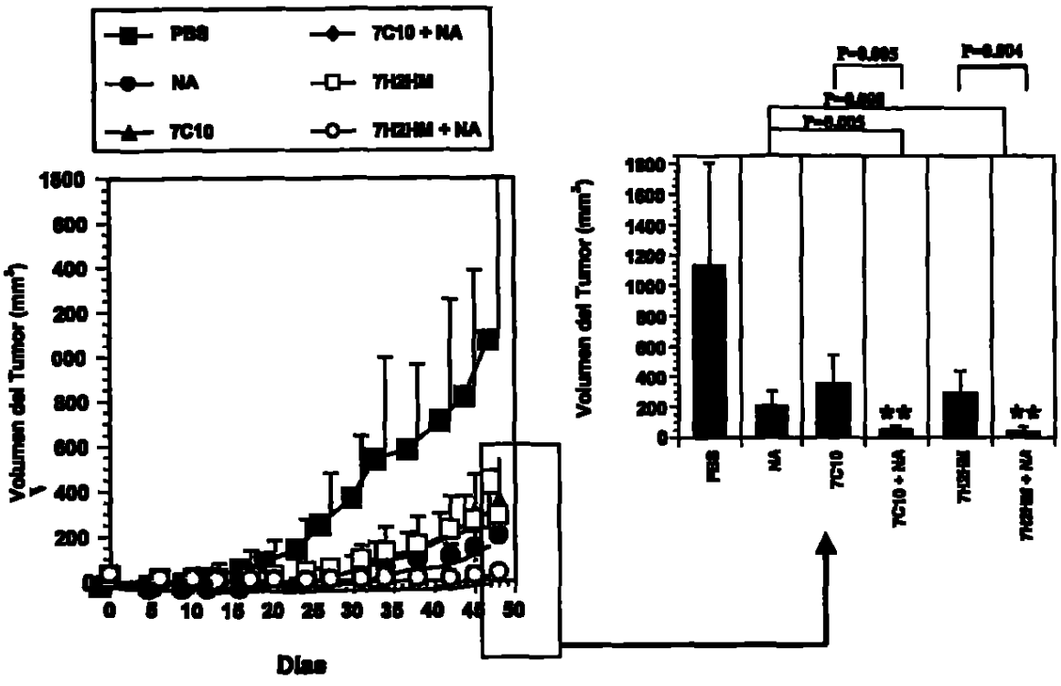


FIGURA 35A FIGURA 35B

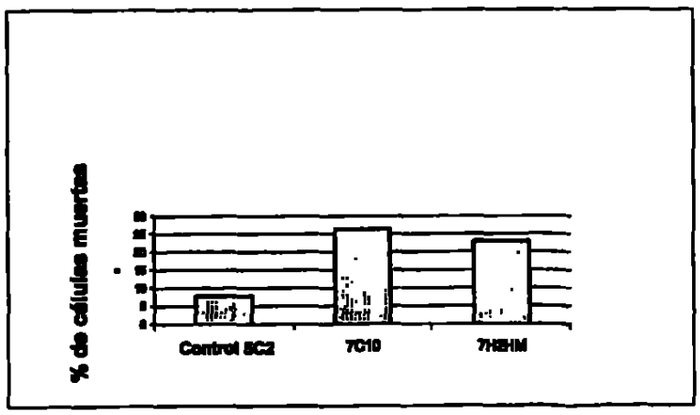


FIGURA 36

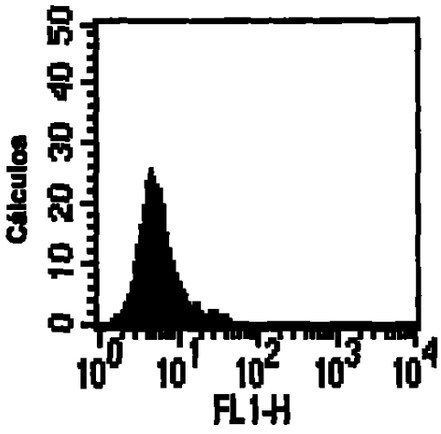


FIGURA 37A

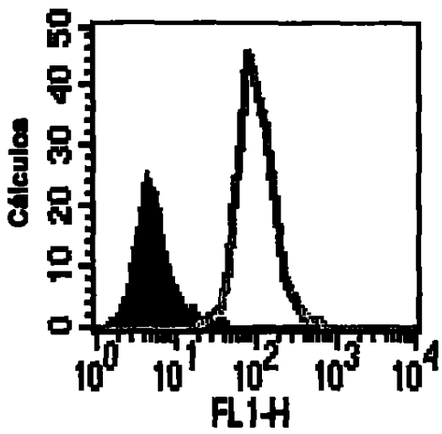


FIGURA 37B

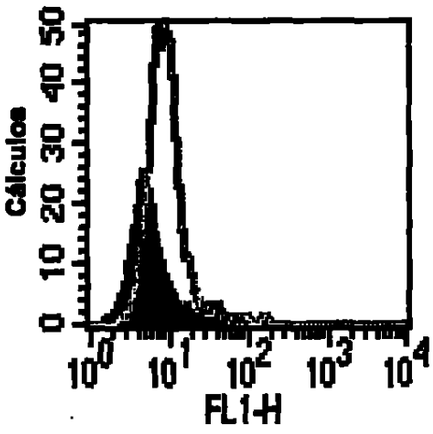


FIGURA 37C

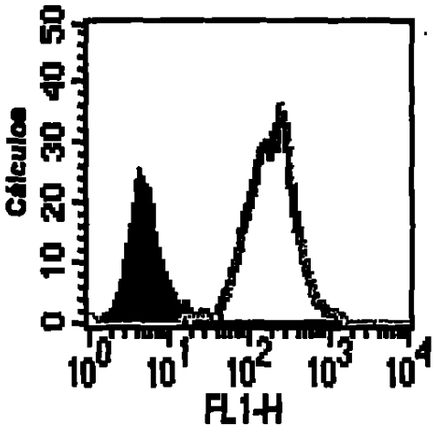


FIGURA 37D

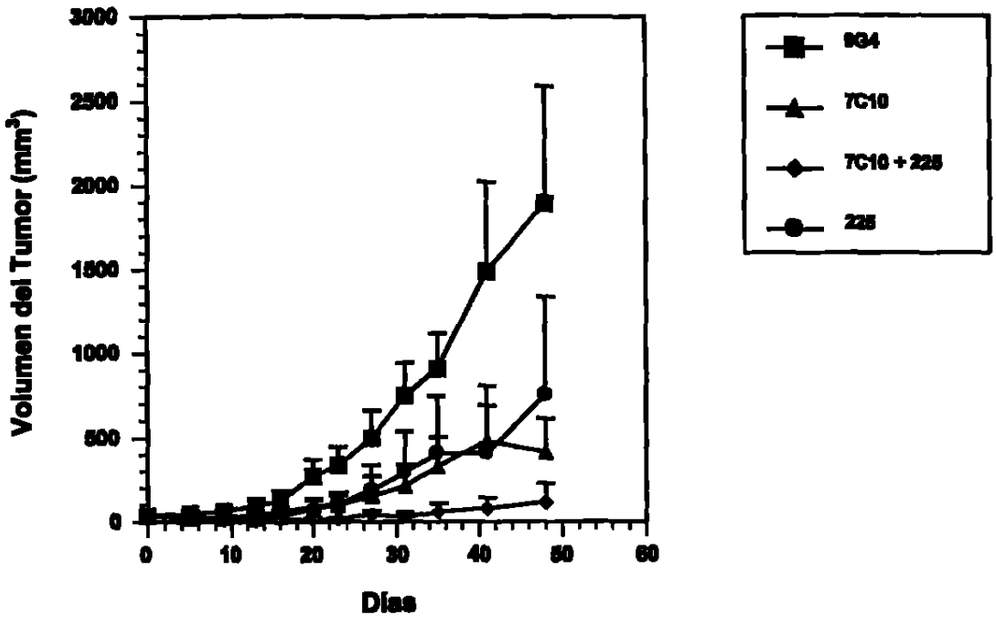


FIGURA 38

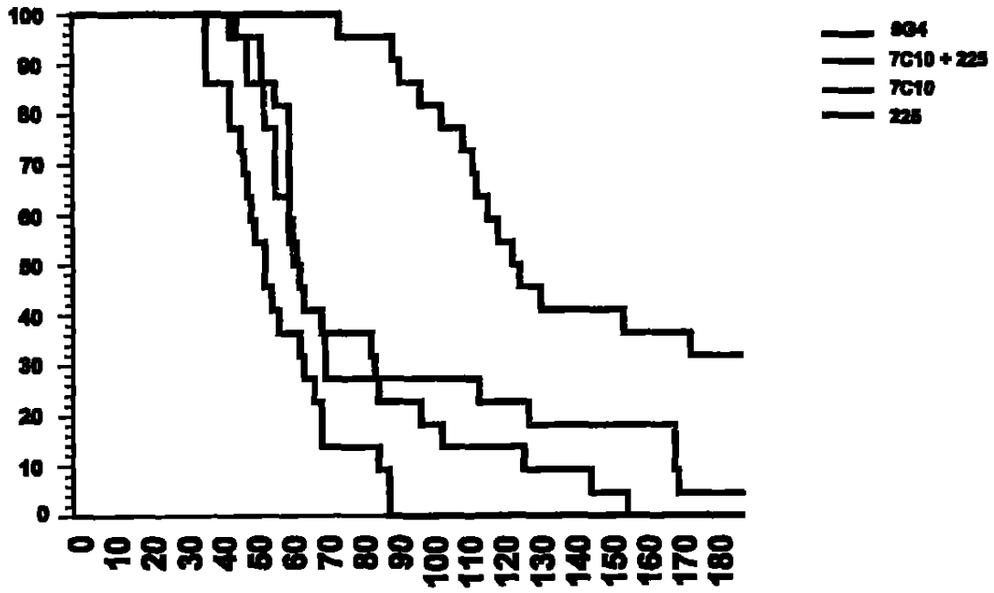


FIGURA 39

FIGURA 40A

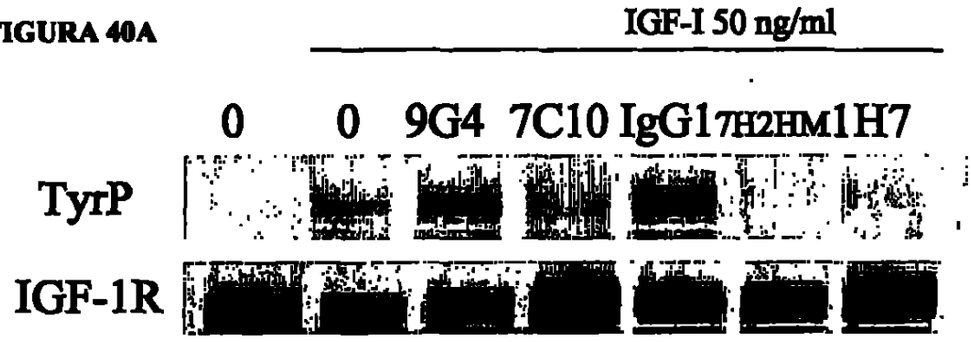
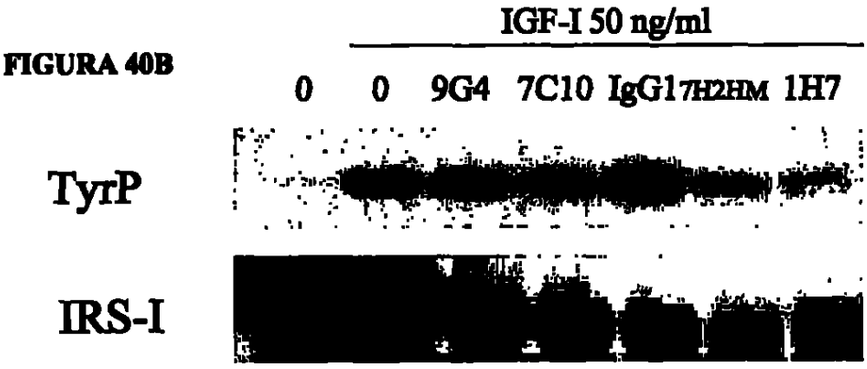


FIGURA 40B



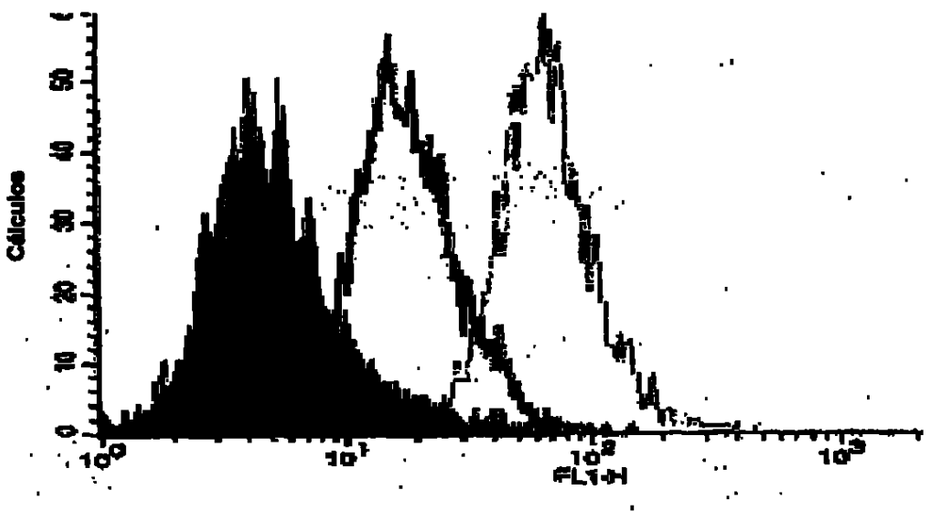


FIGURA 41

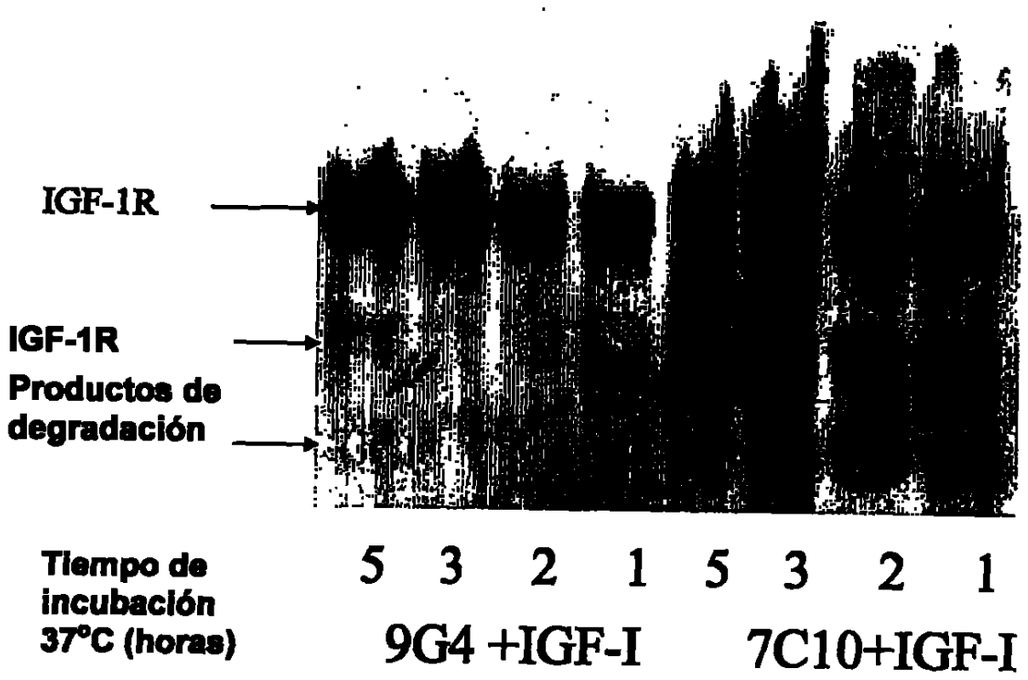


FIGURA 42A

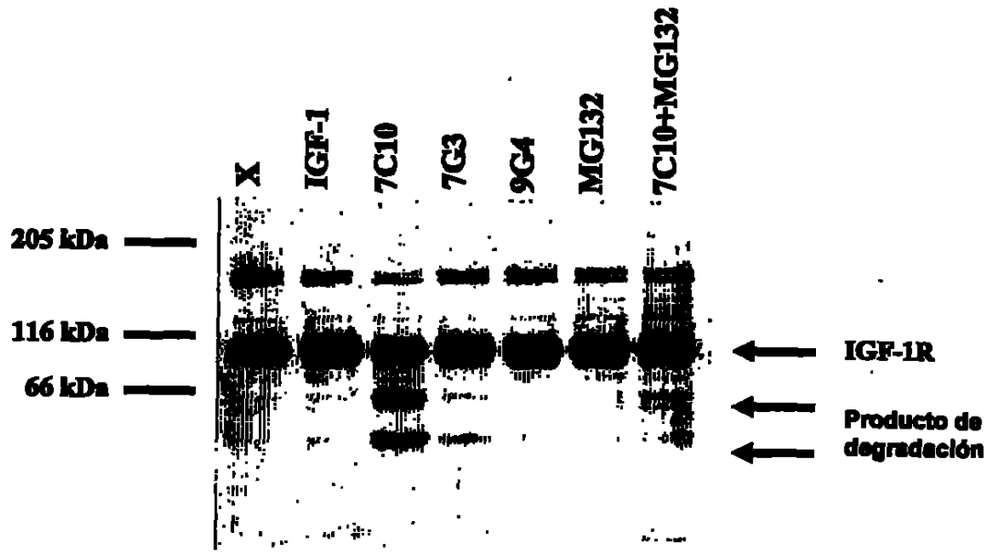


FIGURA 42B

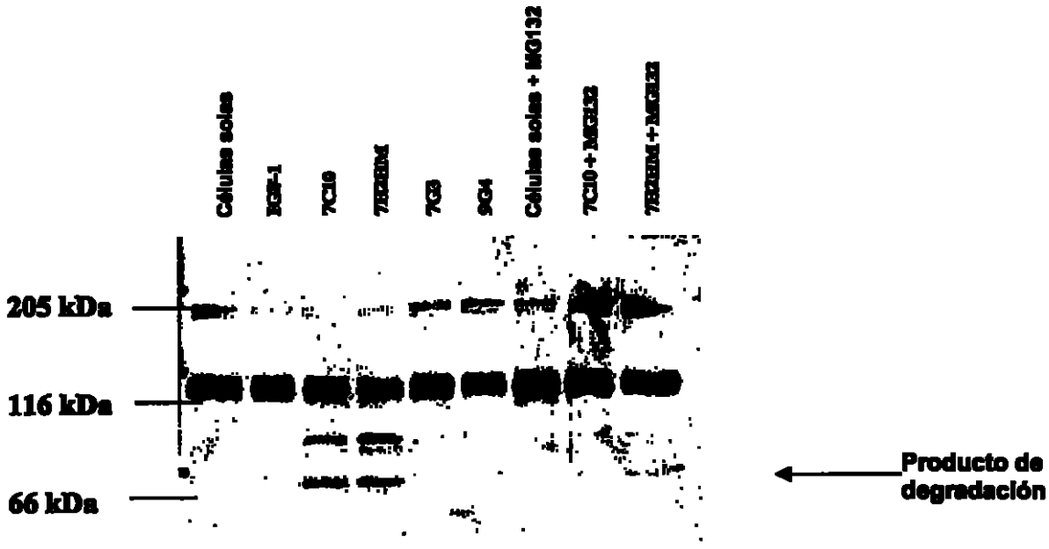

Células solas
IGF-1
7C10
7C3
SC4
Células solas + MG132
7C10 + MG132
205 kDa
116 kDa
66 kDa
Producto de degradación

FIGURA 42C

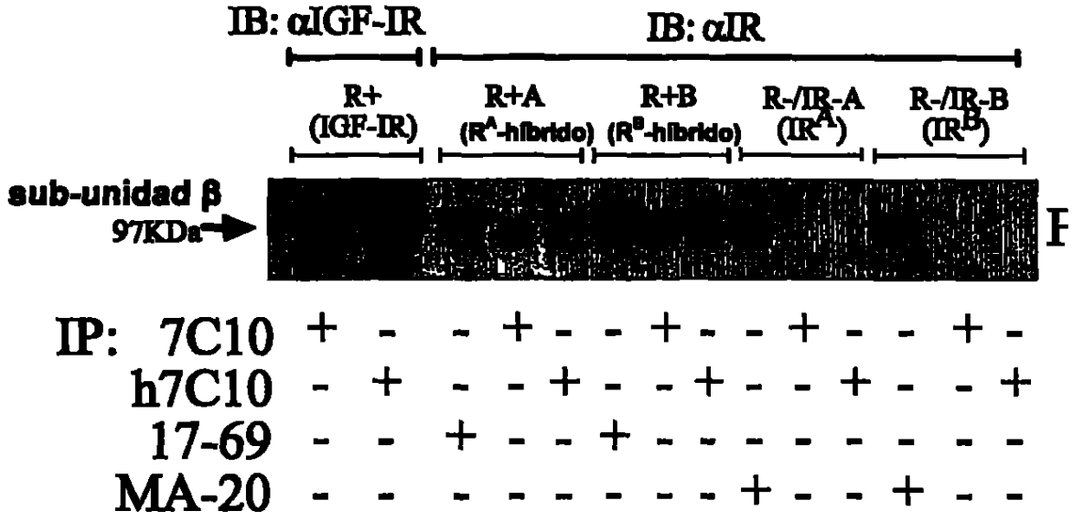


FIGURA 43A

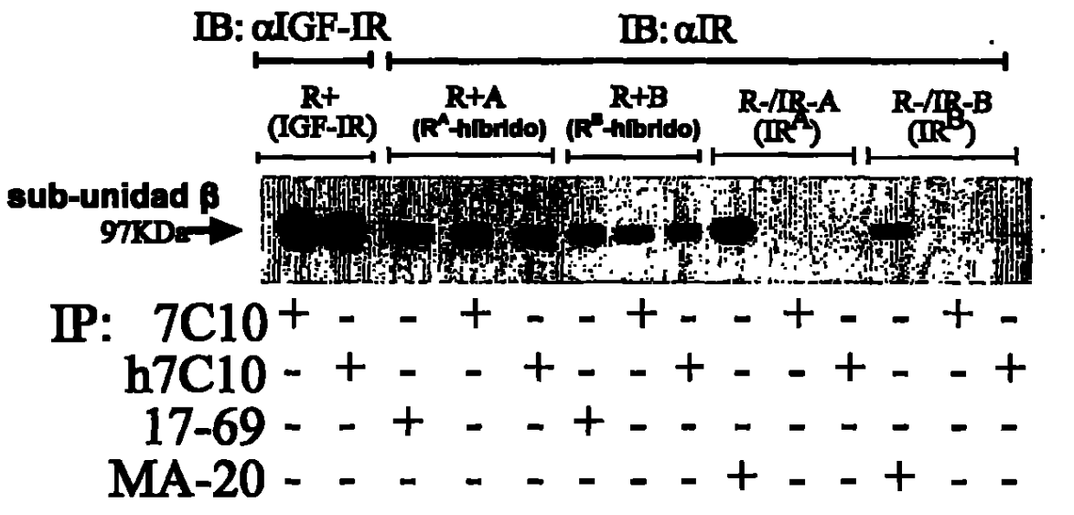


FIGURA 43B

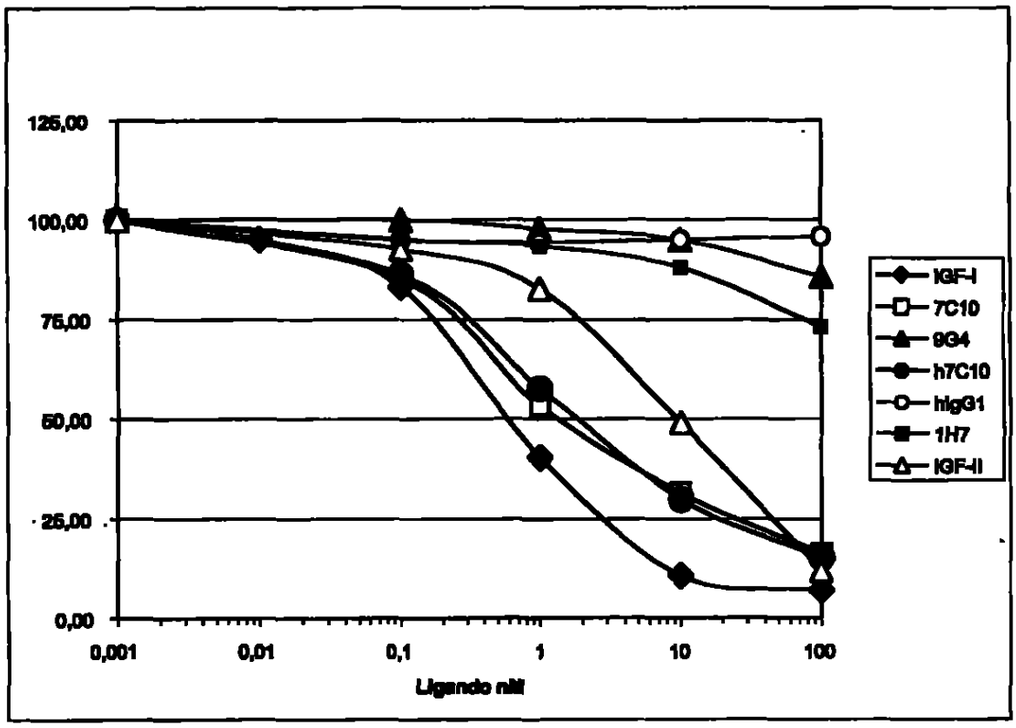

125,00
100,00
75,00
50,00
25,00
0,00
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Ligando nM
IGF-I
7C10
9G4
h7C10
hIgG1
1H7
IGF-II

FIGURA 44

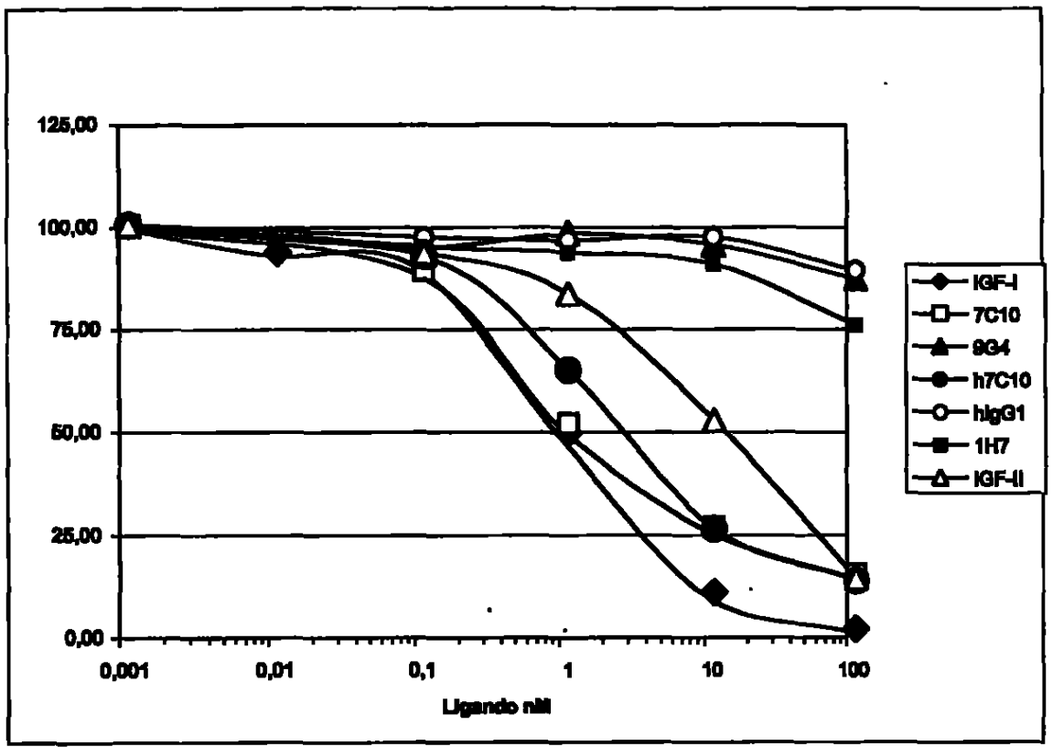

125,00
100,00
75,00
50,00
25,00
0,00
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Ligando nM
IGF-I
7C10
9G4
h7C10
hIgG1
1H7
IGF-II

FIGURA 45

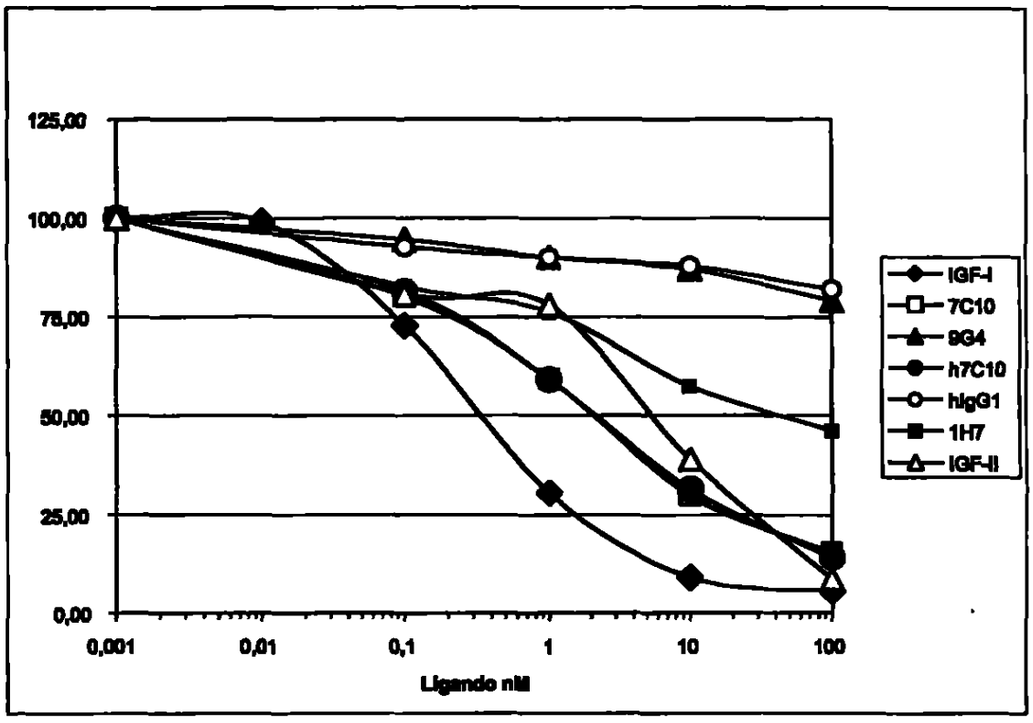

125,00
100,00
75,00
50,00
25,00
0,00
0,001
0,01
0,1
1
10
100
Ligando nM
IGF-I
7C10
9G4
h7C10
hIgG1
1H7
IGF-II

FIGURA 46



FIGURA 47A

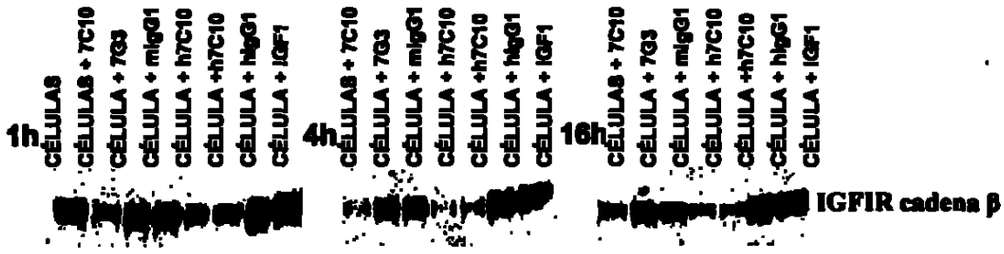


FIGURA 47B

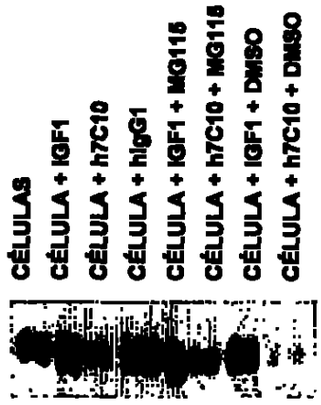


FIGURA 48

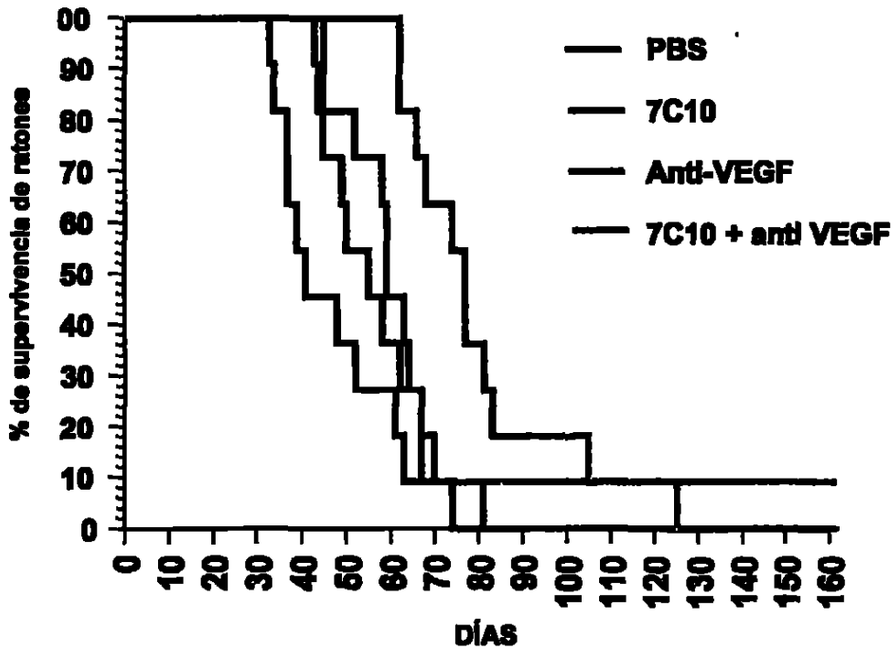


FIGURA 49

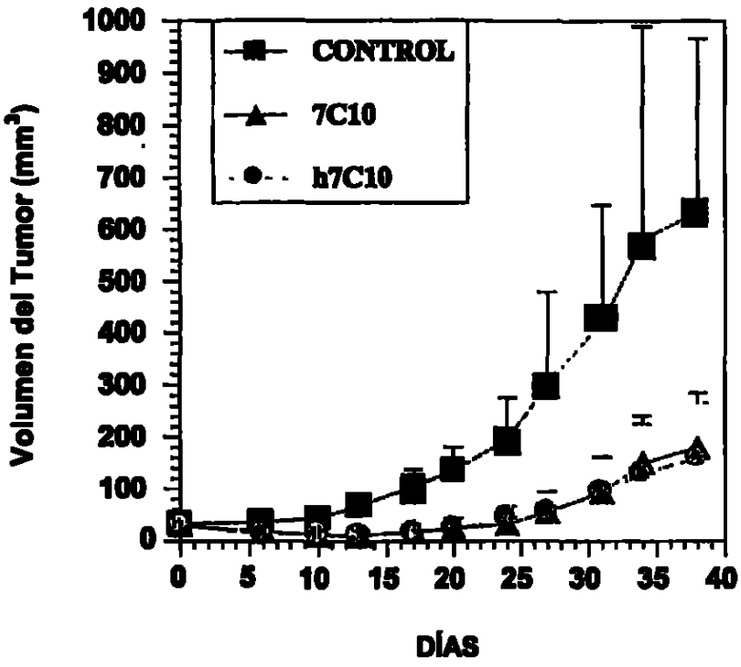


FIGURA 50

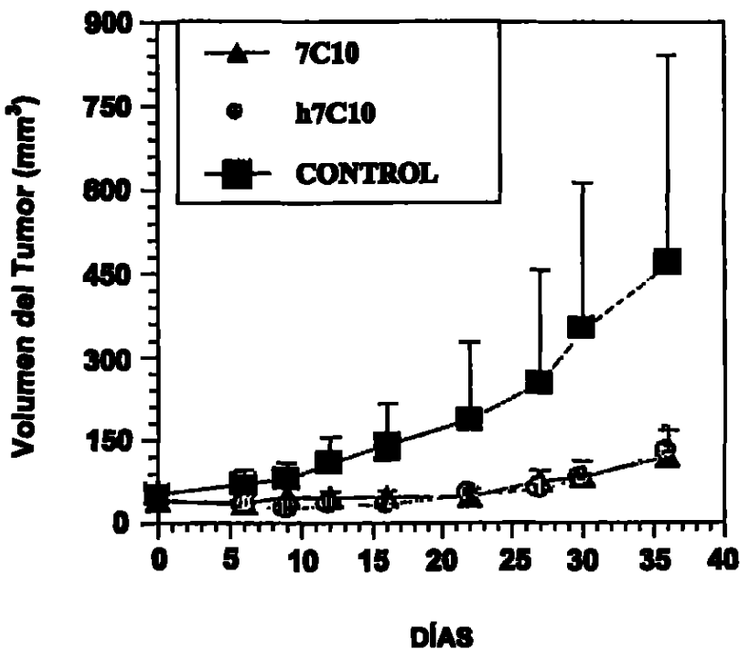


FIGURA 51

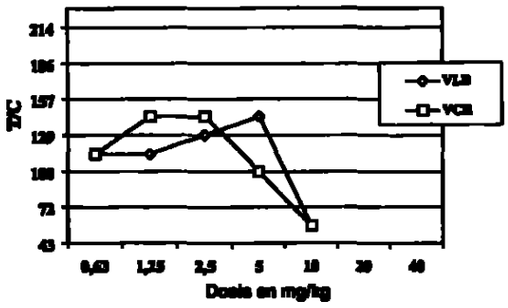


FIGURA 52

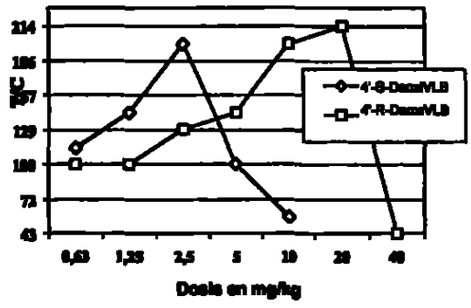


FIGURA 53

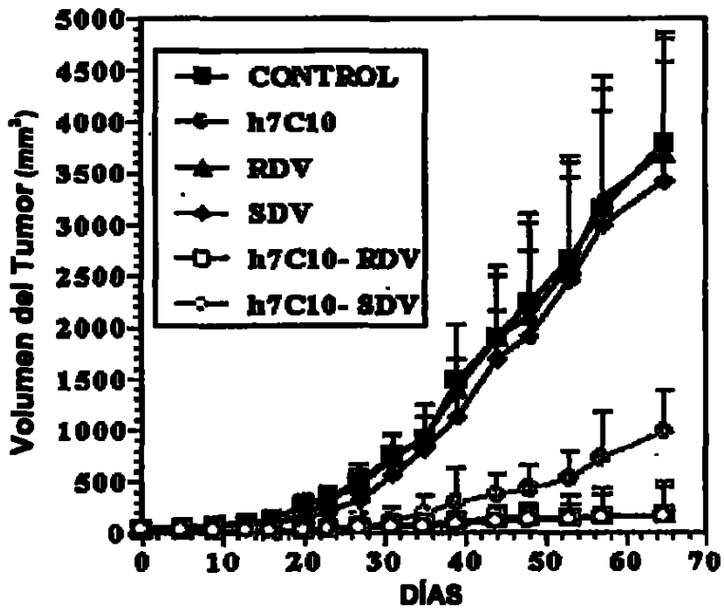


FIGURA 54

469

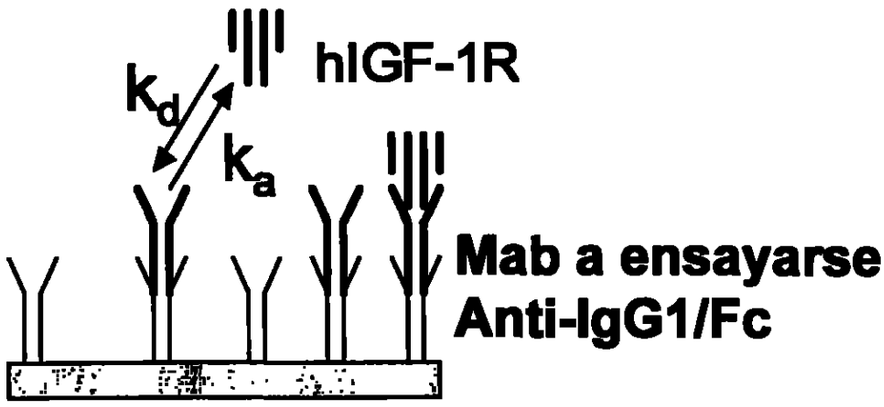


FIGURA 55

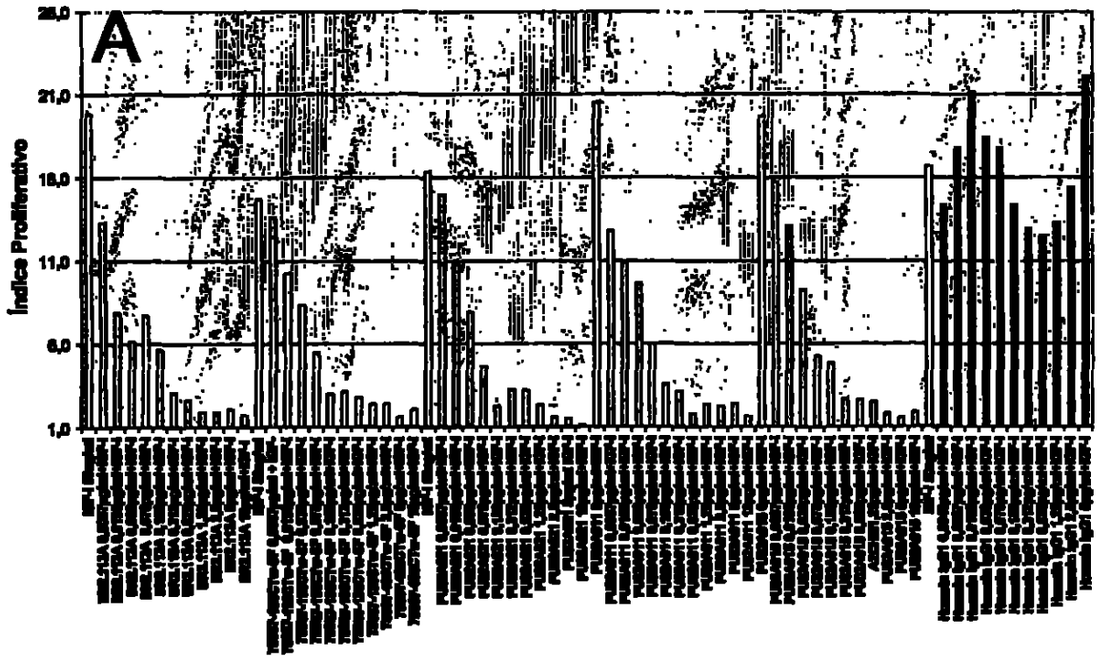


FIGURA 56A

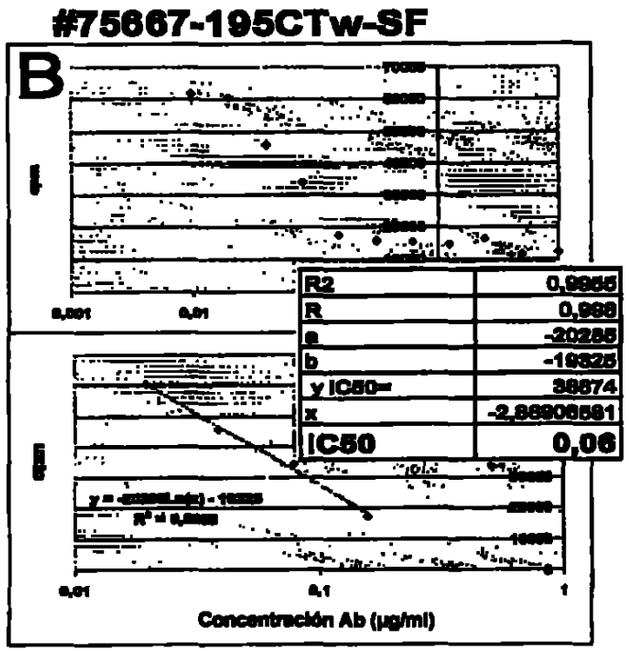


FIGURA 56B

C

Lote Número	Valor IC_{50} µg/ml (nM)
#75667-195CTw-SF	0.06 (0.40)
#BR2.113A	0.05 (0.33)
#PU02A021	0.04 (0.27)
#PU02A011	0.04 (0.27)
#PU02A015	0.04 (0.27)

FIGURA 56C

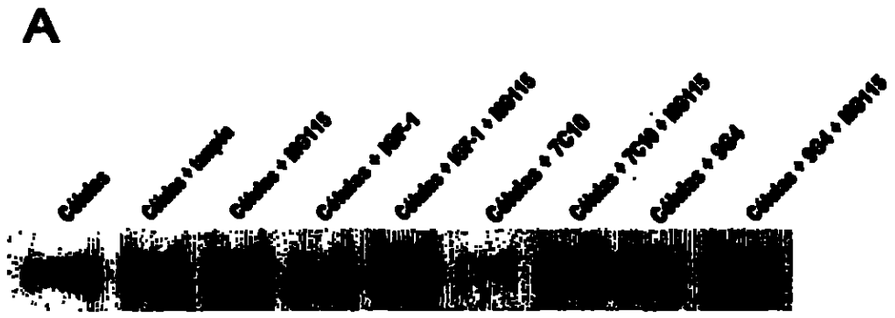


FIGURA 57A

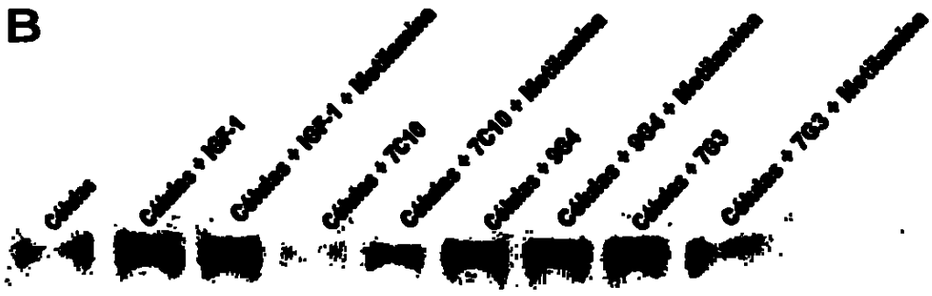


FIGURA 57B

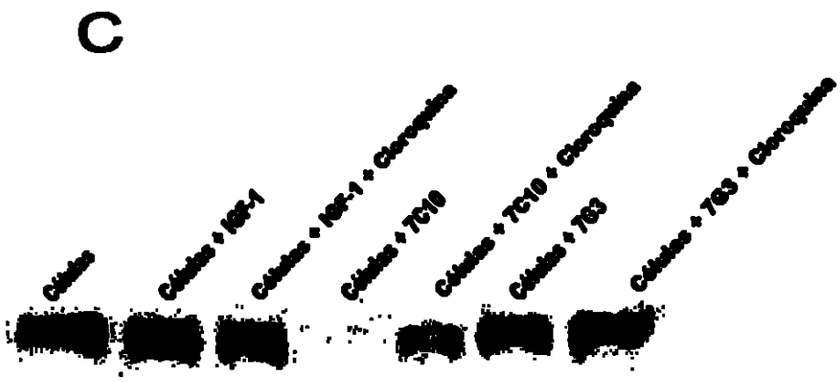


FIGURA 57C

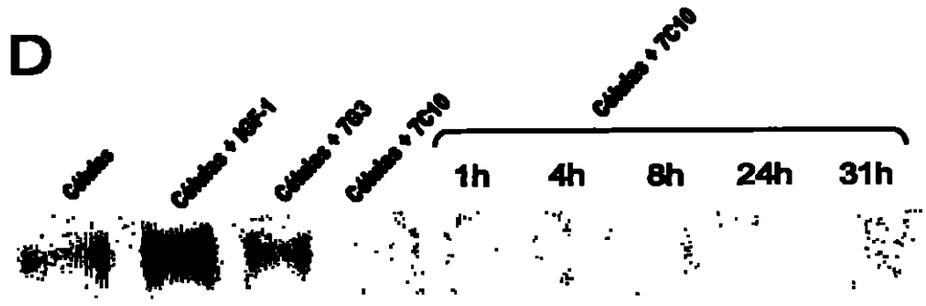


FIGURA 57D

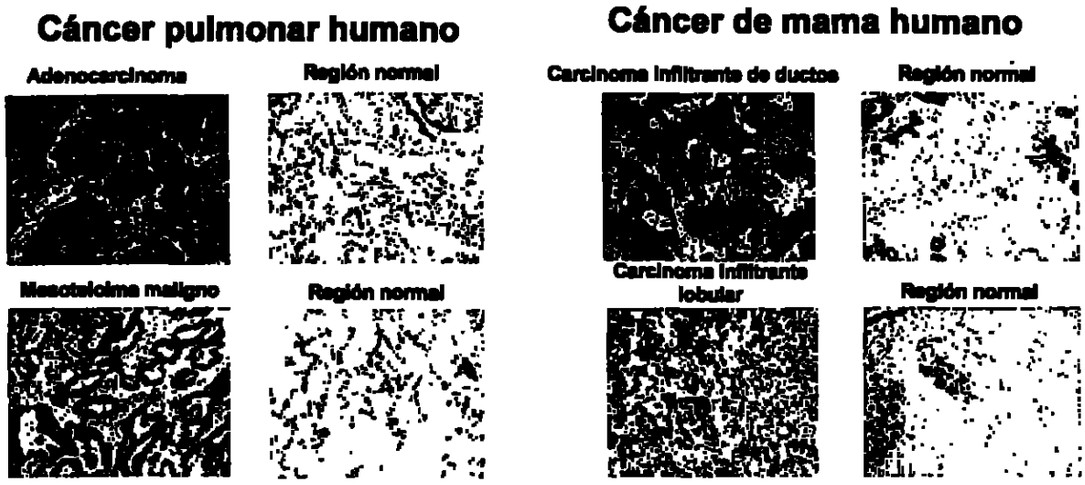


FIGURA 58

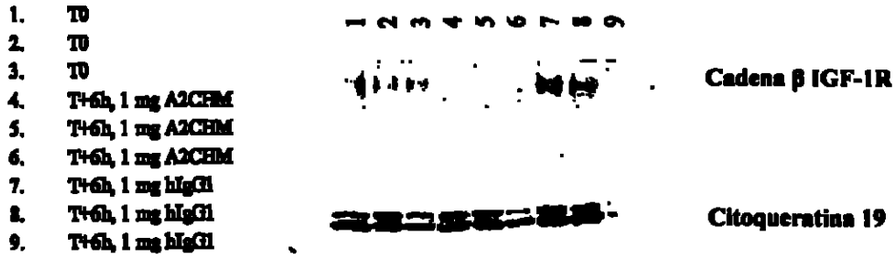
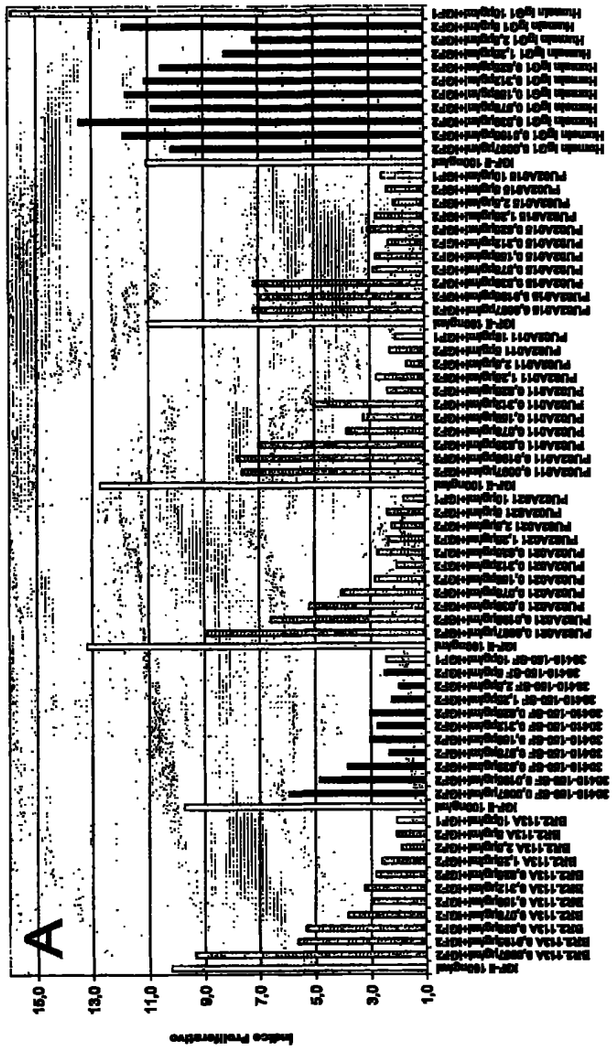


FIGURA 59


A
Indice Proliferativo
15,0
13,0
11,0
9,0
7,0
5,0
3,0
1,0

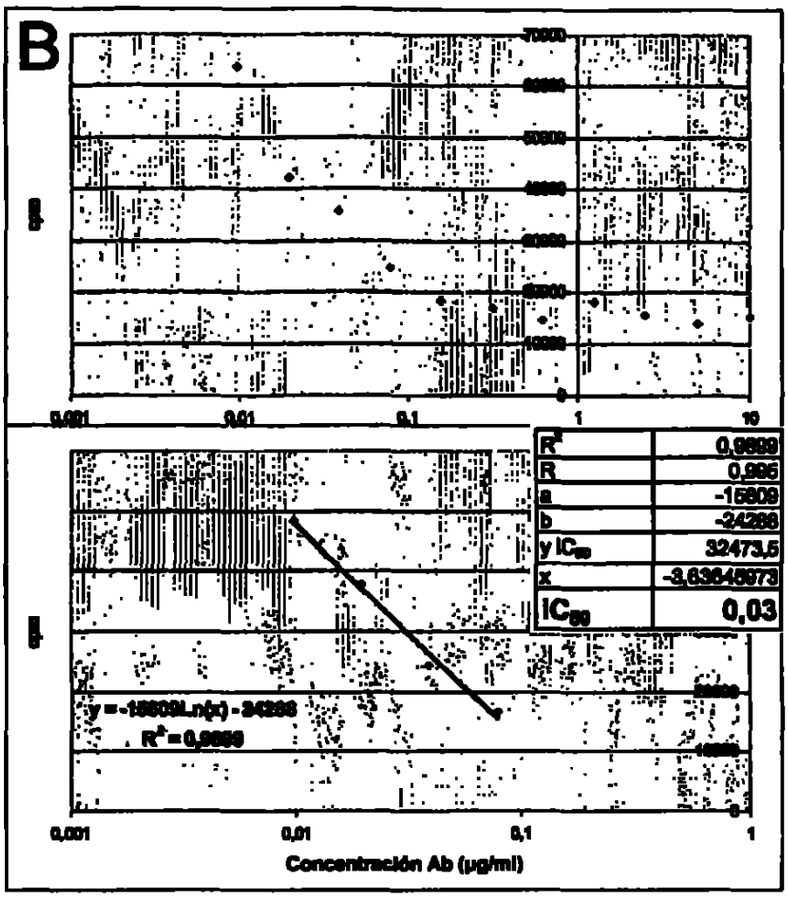


FIGURA 60B

C

Lote Número	Valor IC_{50} µg/ml (nM)
#30410-150-SF	0.03 (0.20)
#BR2.113A	0.04 (0.27)
#PU02A021	0.04 (0.27)
#PU02A011	0.05 (0.33)
#PU02A015	0.04 (0.27)

FIGURA 60C

LISTADO DE SECUENCIAS

<120>PIERRE FABRE MEDICAMENT
GOETSCH, Liliane
CORVAIA, Nathalie
LEGER, Olivier
DUFLOS, Alain
BECK, Alain
HAEUW, Jean-Francois

<120> Anticuerpos novedosos anti-receptor del factor de crecimiento I tipo insulina, y usos de los mismos

<130> 346 317 - MX

<150> PCT/FR 03/00 178
<151> 2003-01-20

<150> FR 02/00 653
<151> 2002-01-18

<150> FR 02/00 654
<151> 2002-01-18

<150> FR 02/05 753
<151> 2002-05-07

<160> 156

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 48
<212> ADN
<213> Mus musculus

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

<400> 1
aga tct agt cag agc att gta cat agt aat gga aac acc tat tta caa 48
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln
1 5 10 15

<210> 2
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 2
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln
1 5 10 15

<210> 3
<211> 21
<212> ADN
<213> Mus musculus

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

<400> 3
aaa gtt tcc aac cga ctt tat 21
Lys Val Ser Asn Arg Leu Tyr
1 5

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4
Lys Val Ser Asn Arg Leu Tyr
1 5

<210> 5
<211> 27
<212> ADN
<213> Mus musculus

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

<400> 5
ttt caa ggt tca cat gtt ccg tgg acg 27
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 7
<211> 18
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(18)

<400> 7
ggt ggt tat tta tgg aac 18
Gly Gly Tyr Leu Trp Asn
1 5

<210> 8
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 8
Gly Gly Tyr Leu Trp Asn
1 5

<210> 9
<211> 48
<212> ADN
<213> Mus musculus

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

<400> 9
tac ata agc tac gac ggt acc aat aac tac aaa cca tct ctc aaa gat 48
Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Asp
1 5 10 15

<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 10
Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Asp
1 5 10 15

<210> 11
<211> 24
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(24)

<400> 11
tac ggt agg gtc ttc ttt gac tac 24
Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr
1 5

<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 12
Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr
1 5

<210> 13
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 13
atgaaatgca gctgggtcat ttcttt 26

<210> 14
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 14
atgggatgga gctrtatcat sytctt 26

<210> 15
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 15
atgaagwtgt ggttaaactg ggtttt 26

<210> 16
<211> 23
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 16
atgractttg ggytcagctt grt 23

<210> 17
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 17
atggactcca ggctcaattt agtttt 26

<210> 18
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 18
atggctgtcy trgagctrct cttctg 26

<210> 19
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 19
atggratgga gckggrtctt tmtctt 26

<210> 20
<211> 23
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 20
atgagagtgc tgattctttt gtg 23

<210> 21
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 21
atggmttggg tgtggamctt gctatt 26

<210> 22
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 22
atgggcagac ttacattctc attcct 26

<210> 23
<211> 28
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 23
atggattttg ggctgatttt ttttattg 28

<210> 24
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 24
atgatggtgt taagtcttct gtacct 26

<210> 25
<211> 29
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 25
atgaagttgc ctgttaggct gttggtgct 29

<210> 26
<211> 29
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 26
atggagwcag acacactcct gytatgggt 29

<210> 27
<211> 23
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 27
atgagtgtgc tcactcaggt cct 23

481 A81

<210> 28
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 28
atgaggrccc ctgctcagwt tyttgg 26

<210> 29
<211> 29
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 29
atggatttwc aggtgcagat twtcagctt 29

<210> 30
<211> 29
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 30
atggatttwc argtgcagat twtcagctt 29

<210> 31
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 31
atgaggtkcy ytgytsagyt yctgrg 26

<210> 32
<211> 23
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 32
atgggcwtca agatggagtc aca 23

<210> 33
<211> 29
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 33
atgtggggay ctktttycmm tttttcaat 29

<210> 34
<211> 24
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 34
atggtrtccw casctcagtt cctt 24

<210> 35
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 35
atgtatatat gtttgttgtc tatttc 26

<210> 36
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 36
atggaagccc cagctcagct tctctt 26

<210> 37
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 37
atgragtywc agacccaggt cttyrt 26

<210> 38
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 38
atggagacac attctcaggt ctttgt 26

<210> 39
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 39
atggattcac aggcccaggt tcttat 26

<210> 40
<211> 20
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 40
actggatggt gggaagatgg 20

<210> 41
<211> 42
<212> ADN
<213> Mus musculus

#83
983

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(42)

<400> 41
gct gat gct gca cca act gta tcc atc ttc cca cca tcc agt 42
Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10

<210> 42
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 42
Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10

<210> 43
<211> 20
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 43
ccatcttccc accatccagt 20

<210> 44
<211> 18
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 44
ccagtggata gacagatg 18

<210> 45
<211> 33
<212> ADN
<213> Mus musculus

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

<400> 45
gcc aaa acg aca ccc cca tct gtc tat cca ctg 33
Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu
1 5 10

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 46
Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu
1 5 10

<210> 47
<211> 21
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 47
cccccatctg tctatccact g 21

<210> 48
<211> 438
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (28)..(393)

<400> 48
atgaagttgc ctgttaggct gttggtg ctg atg ttc tgg att cct gct tcc aga 54
Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala Ser Arg
1 5

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

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

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

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

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

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

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

aaa cgg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc ccaccatcca gt 438
Lys

<210> 49
<211> 122
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 49
Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala Ser Arg Ser Asp Val Leu Met Thr Gln
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 50
tacttcaacg gacaatccga caaccacgac tacaagacct aaggacgaag gtcttcacta 60
caaaactact gggtttaagg tgagagggac ggacagtcag aacctctagt tcggaggtag 120
agaacgtcta gatcagtctc gtaacatgta tcattacctt tgtggataaa tgttaccatg 180
gacgtctttg gtccagtcag aggtttcgag gactagatgt ttcaaaggtt ggctgaaata 240
ccccagggtc tgtccaagtc accgtcacct agtccctgtc taaagtgtga gttctagtcg 300
tcgcacctcc gactcctaga ccctcaaata atgacgaaag ttccaagtgt acaaggcacc 360
tgcaagccac ctccgtggtt cgacctttag tttgcccgac tacgacgtgg ttgacatagg 420
tagaagggtg gtaggtca 438

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

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

<400> 51
atgatggtgt taagtcttct gtac ctc ttg aca gcc att cct ggt atc ctg 51
Leu Leu Thr Ala Ile Pro Gly Ile Leu
1 5

tct gat gta cag ctt cag gag tca gga cct ggc ctc gtg aaa cct tct 99
Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
10 15 20 25

A35
486

```
cag tct ctg tct ctc acc tgc tct gtc acc ggc tac tcc atc acc ggt   147
Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Gly
                30                  35                  40

ggt tat tta tgg aac tgg atc cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg gag   195
Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu
            45                  50                  55

tgg atg ggc tac ata agc tac gac ggt acc aat aac tac aaa cca tct   243

Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser
        60                  65                  70

ctc aaa gat cga atc tcc atc act cgt gac aca tct aag aac cag ttt   291
Leu Lys Asp Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
    75                  80                  85

ttc ctg aag ttg aat tct gtg act aat gaa gac aca gct aca tat tac   339
Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
90                  95                  100                 105

tgt gca aga tac ggt agg gtc ttc ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc   387
Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
                110                 115                 120

act ctc aca gtc tcc tca gccaaaacga caccccatc tgtctatcca ctg      438
Thr Leu Thr Val Ser Ser
            125
```

<210> 52
<211> 127
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 52

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

Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys
            20                  25                  30

Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Gly Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile
        35                  40                  45

Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr
    50                  55                  60

Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Asp Arg Ile Ser Ile
65                  70                  75                  80

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

Thr Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val
            100                 105                 110

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

<210> 53
<211> 438
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 53
tactaccaca attcagaaga catggacaac tgtcggtaag gaccatagga cagactacat 60
gtcgaagtcc tcagtcctgg accggagcac tttggaagag tcagagacag agagtggacg 120
agacagtggc cgatgaggta gtggccacca ataaatacct tgacctaggc cgtcaaaggt 180
cctttgtttg acctcaccta cccgatgtat tcgatgctgc catggttatt gatgtttggt 240
agagagtttc tagcttagag gtagtgagca ctgtgtagat tcttggtcaa aaaggacttc 300
aacttaagac actgattact tctgtgtcga tgtataatga cacgttctat gccatcccag 360
aagaaactga tgaccccggt tccgtggtga gagtgtcaga ggagtcggtt ttgctgtggg 420
ggtagacaga taggtgac 438

<210> 54
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 54
Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 55
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 55
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

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

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

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

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

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys
100 105 110

<210> 56
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 56
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 57
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 57
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

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

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

489
489

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

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 58
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 59
<211> 100
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Leu Gln Thr Pro
100

<210> 60
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANTE
<222> (35)..(36)
<223> Xaa = cualquier aminoácido

<220>
<221> VARIANTE
<222> (39)
<223> Xaa = cualquier aminoácido

<220>
<221> VARIANTE
<222> (99)
<223> Xaa = cualquier aminoácido

<400> 60
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 61
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 62
<211> 433
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (22)..(414)

<400> 62
gtcagaacgc gtgccgccac c atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg 51
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu
1 5 10

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 63
<211> 131
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Phe Pro Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ile Lys
130

<210> 64
<211> 433
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 64
cagtcttgcg cacggcggtg gtacttcaac ggacaatccg acaaccacga ctacaagacc 60
aaaggacgaa ggtcgtcact acaacactac tgagtcagag gtgagaggga cgggcagtgg 120
ggacctctcg gccggaggta gaggacgtcc agatcagtct cgtaacatgt atcattacct 180
ttgtggataa acgttaccat ggacgtcttc ggtcccgtca gaggtgtcga ggactagata 240
tttcaaagat tagccgaaat accccaggga ctgtccaagt caccgtcacc tagtccgtgt 300
ctaaaatgtg acttttagtc gtctcacctc cgactcctac aaccccaaat aatgacgaaa 360
gttccaagtg tacaaggcac ctgcaagccg gttccctggt tccaccttta gtttgcactc 420
acctaggaga cgc 433

<210> 65
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 66
<211> 433
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (22)..(414)

<400> 66
gtcagaacgc gtgccgccac c atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg 51
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu
1 5 10

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 67
<211> 131
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Phe Pro Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

Glu Ile Lys
130

<210> 68
<211> 433
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 68
cagtcttgcg cacggcggtg gtacttcaac ggacaatccg acaaccacga ctacaagacc 60
aaaggacgaa ggtcgtcact acaacactac tgagtcagag gtgagaggga cgggcagtgg 120
ggacctctcg gccggaggta gaggacgtcc agatcagtct cgtaacatgt atcattacct 180
ttgtggataa acgttaccat ggacgtcttc ggtcccgtca gaggtgtcga ggactagata 240
tttcaaagat tagccgaaat accccaggga ctgtccaagt caccgtcacc tagtccgtgt 300
ctaaaatgtg acttttagtc gtctcacctc cgactcctac aaccccaaat aatgacgaaa 360
gttccaagtg tacaaggcac ctgcaagccg gttcccctggt tccaccttta gtttgcactc 420
acctaggaga cgc 433

<210> 69
<211> 117
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 69
Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

AP5
495

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

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

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

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

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

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 70
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 70
Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 71
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 71
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 72
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 72
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

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

Ile Gly Arg Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Xaa Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 73
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 73
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

<210> 74
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 74
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg

<210> 75
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 76
<211> 445
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (22)..(426)

<400> 76

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

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

cca gga ctg gtg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc   147
Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val
             30                  35                  40

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

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

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

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

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

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

tcctctgcg                                                        445


<210> 77
<211> 135
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77
Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu Thr Ala Ile Pro Gly Ile
  1               5                  10                  15

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    130


<210> 78
<211> 445
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 78
cagtcttgcg cacggcggtg gtactttcac aactcagaca acatggagaa ctgtcggtaa 60
ggaccatagg acagagtcca cgtcgaagtc ctcagcccgg gtcctgacca cttcggaagc 120
ctctgggaca gggagtggac gtgacagaga ccaatgaggt agtggccacc aataaatacc 180
ttgacctatg ccgtcggggg tcccttccct gacctcacct accccatata gtcgatgctg 240
ccatggttat tgatgtttgg gagggagttc ctagcttagt ggtatagtgc actgtgcagg 300
ttcttggtca agagggactt cgactcgaga cactggcgac gcctgtgacg tcacataatg 360
acacgctcta tgccatccca gaagaaactg atgaccccgg tcccttggga ccagtggcag 420
aggagtccac tcacctagga gacgc                                       445


<210> 79
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 79
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 80
<211> 445
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (22)..(426)

<400> 80
gtcagaacgc gtgccgccac c atg aaa gtg ttg agt ctg ttg tac ctc ttg 51
Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu
1 5 10

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

cca gga ctg gtg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc 147
Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val
30 35 40

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

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

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

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

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

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

tcctctgcg                                                        445
```

<210> 81
<211> 135
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 81

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    130
```

<210> 82
<211> 445
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 82

```
cagtcttgcg cacggcggtg gtactttcac aactcagaca acatggagaa ctgtcggtaa 60
ggaccatagg acagagtcca cgtcgaagtc ctcagcccgg gtcctgacca cttcggaagc 120
ctctgggaca gggagtggac gtgacagaga ccaatgaggt agtcgccacc aataaatacc 180
ttgacctatg ccgtcggggg tcccttccct gacctcacct agcccatata gtcgatgctg 240
ccatggttat tgatgtttgg gagggagttc ctagctcagt ggtatagtgc actgtgcagg 300
```

ttcttggtca agagggactt cgactcgaga cactggcgac gcctgtgacg tcacataatg 360
acacgctcta tgccatccca gaagaaactg atgaccccgg tcccttggga ccagtggcag 420
aggagtccac tcacctagga gacgc 445

<210> 83
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 83
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 84
<211> 445
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (22)..(426)

<400> 84
gtcagaacgc gtgccgccac c atg aaa gtg ttg agt ctg ttg tac ctc ttg 51
Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu
1 5 10

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

cca gga ctg gtg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc 147
Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val
30 35 40

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

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

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

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

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

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

tcctctgcg                                                        445
```

<210> 85
<211> 135
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 85

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    130
```

<210> 86
<211> 445
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 86
cagtcttgcg cacggcggtg gtactttcac aactcagaca acatggagaa ctgtcggtaa 60
ggaccatagg acagagtcca cgtcgaagtc ctcagcccgg gtcctgacca cttcggaagc 120
ctctgggaca gggagtggac gtgacagaga ccaatgaggt agtcgccacc aataaatacc 180
ttgacctatg ccgtcggggg tcccttccct gacctcacct agcccatata gtcgatgctg 240
ccatggttat tgatgtttgg gagggagttc ctagctcagt ggtatagtca cctgtgcagg 300
ttcttggtca agagggactt cgactcgaga cactggcgac gcctgtgacg tcacataatg 360
acacgctcta tgccatccca gaagaaactg atgaccccgg tcccttggga ccagtggcag 420
aggagtccac tcacctagga gacgc 445

<210> 87
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 87
gtcagaacgc gtgccgcc 18

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

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 88
accatgaagt tgcctgttag gctgttggtg ct 32

<210> 89
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 89
gatgttctgg tttcctgctt ccagcagtga tg 32

<210> 90
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 90
ttgtgatgac tcagtctcca ctctccctgc cc 32

<210> 91
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 91
gtcacccctg gagagccggc ctccatctcc tg 32

<210> 92
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 92
caggtctagt cagaccatta tacatagtaa tg 32

<210> 93
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 93
gaaacaccta tttggaatgg tacctgcaga 30

<210> 94
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 94
ggcaacttca tggtggcggc acgcgttctg ac 32

<210> 95
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

506

<400> 95
gaaaccagaa catcagcacc aacagcctaa ca 32

<210> 96
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 96
ctgagtcatc acaacatcac tgctggaagc ag 32

<210> 97
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 97
tctccagggg tgacgggcag ggagagtgga ga 32

<210> 98
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 98
tctgactaga cctgcaggag atggaggccg gc 32

<210> 99
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 99
aaataggtgt ttccattact atgtacaatg c 31

<210> 100
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 100
cagggcagtc tccacagctc ctgatctata aa 32

<210> 101
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 101
gtttctaatc ggctttatgg ggtccctgac ag 32

<210> 102
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 102
gttcagtggc agtggatcag gcacagattt ta 32

<210> 103
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 103
cactgaaaat cagcagagtg gaggctgagg at 32

<210> 104
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 104
gttggggttt attactgctt tcaaggttca ca 32

<210> 105
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 105
tgttccgtgg acgttcggcc aagggaccaa gg 32

<210> 106
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 106
tggaaatcaa acgtgagtgg atcctctgcg 30

<210> 107
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 107
tctgcaggta ccattgc 17

<210> 108
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 108
tgcaatggta cctgcagaag c 21

<210> 109
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

F09
509

<400> 109
agactgccct ggcttctgca ggtaccattg ca 32

<210> 110
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 110
cgattagaaa ctttatagat caggagctgt gg 32

<210> 111
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 111
tgccactgaa cctgtcaggg accccataaa gc 32

<210> 112
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 112
gattttcagt gtaaaatctg tgcctgatcc ac 32

<210> 113
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 113
taaaccccaa catcctcagc ctccactctg ct 32

<210> 114
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 114
tccacggaac atgtgaacct tgaaagcagt aa 32

<210> 115
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 115
tttgatttcc accttggtcc cttggccgaa c 31

<210> 116
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 116
cgcagaggat ccactcacg 19

<210> 117
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 117
gtcagaacgc gtgccgcc 18

<210> 118
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 118
accatgaaag tgttgagtct gttgtacctc ttga 34

JH
511

<210> 119
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 119
cagccattcc tggtatcctg tctcaggtgc agct 34

<210> 120
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 120
tcaggagtcg ggcccaggac tggtgaagcc ttcg 34

<210> 121
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 121
gagaccctgt ccctcacctg cactgtctct ggt 33

<210> 122
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 122
tactccatca ccggtggtta tttatggaac tgg 33

<210> 123
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

FR
512

<400> 123
atacggcagc ccccagggaa gggactggag tgg 33

<210> 124
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 124
atggggtata tcagctacga cggtaccaat aac 33

<210> 125
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 125
tcaacacttt catggtggcg gcacgcgttc tgac 34

<210> 126
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 126
ataccaggaa tggctgtcaa gaggtacaac agac 34

<210> 127
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 127
tgggcccgac tcctgaagct gcacctgaga cagg 34

<210> 128
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 128
tgagggacag ggtctccgaa ggcttcacca gtcc 34

<210> 129
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 129
ccaccggtga tggagtaacc agagacagtg cagg 34

<210> 130
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 130
ccctgggggc tgccgtatcc agttccataa ataa 34

<210> 131
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 131
tagctgatat accccatcca ctccagtccc tt 32

<210> 132
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 132
gttattggta ccgtcg 16

<210> 133
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 133
tacgacggta ccaataacta c 21

<210> 134
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 134
aaaccctccc tcaaggatcg aatcaccata tc 32

<210> 135
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 135
acgtgacacg tccaagaacc agttctccct ga 32

<210> 136
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 136
agctgagctc tgtgaccgct gcggacactg ca 32

<210> 137
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial:
Oligonucleótido

<400> 137
gtgtattact gtgcgagata cggtagggtc tt 32

<210> 138
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 138
ctttgactac tggggccagg gaaccctggt ca 32

<210> 139
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 139
ccgtctcctc aggtgagtgg atcctctgcg 30

<210> 140
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 140
agggagggtt tgtagttatt ggtaccgtcg ta 32

<210> 141
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 141
acgtgtcacg tgatatggtg attcgatcct tg 32

<210> 142
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 142
agagctcagc ttcagggaga actggttctt gg 32

<210> 143
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 143
cagtaataca ctgcagtgtc cgcagcggtc ac 32

<210> 144
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 144
agtagtcaaa gaagacccta ccgtatctcg ca 32

<210> 145
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 145
ctgaggagac ggtgaccagg gttccctggc ccc 33

<210> 146
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 146
cgcagaggat ccactcac 18

<210> 147
<211> 31
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 147
ctggttactc catcagcggt ggttatttat g 31

<210> 148
<211> 31
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 148
cataaataac caccgctgat ggagtaacca g 31

<210> 149
<211> 31
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 149
gggactggag tggatcgggt atatcagcta c 31

<210> 150
<211> 31
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 150
gtagctgata tacccgatcc actccagtcc c 31

<210> 151
<211> 31
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 151
tccctcaagg atcgagtcac catatcacgt g 31

<210> 152
<211> 31
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 152
cacgtgatat ggtgactcga tccttgaggg a 31

<210> 153
<211> 39
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 153
gatcgagtca ccatatcagt ggacacgtcc aagaaccag 39

<210> 154
<211> 39
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 154
ctggttcttg gacgtgtcca ctgatatggt gactcgatc 39

<210> 155
<211> 31
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 155
gcttccagca gtgatattgt gatgactcag t 31

<210> 156
<211> 31
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 156
actgagtcat cacaatatca ctgctggaag c 31

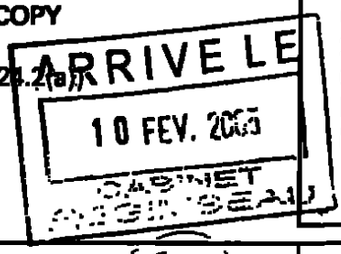
PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))



To:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
20, rue de Chazelles
Cedex 17
F-75847 Paris
France

Date of mailing (day/month/year)	IMPORTANT NOTIFICATION
31 January 2005 (31.01.2005)	
Applicant's or agent's file reference	**International application No.**
347115 D19919	PCT/IB2004/004360

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

PIERRE FABRE MEDICAMENT (for all designated States except US)
GOETSCH, Liliane et al (for US)

International filing date	:	16 December 2004 (16.12.2004)
Priority date(s) claimed	:	16 December 2003 (16.12.2003)
Date of receipt of the record copy by the International Bureau	:	25 January 2005 (25.01.2005)
List of designated Offices	:	

AP :BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW
EA :AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM
EP :AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR
OA :BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG
National :AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 338.70.60

Authorized officer:

Hortensia SANTIAGO (Fax : 338 70 60)

Telephone No. (41-22) 338 9588

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated on the cover sheet of this Notification by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by Articles 22 and 39 and the applicable national laws. In addition, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. It is the applicant's responsibility to ensure the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

The applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be **30 MONTHS** from the priority date, not only in respect of any elected Office if a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of 19 months from the priority date (see Article 39(1)), but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of that designated Office. For further details, see PCT Gazette No. 44/2001 of 1 November 2001, pages 19926, 19932 and 19934, as well as the PCT Newsletter, October and November 2001 and February 2002 issues.

In practice, time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain designated or elected Offices. For regular updates on the applicable time limits (20, 21, 30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the PCT Gazette("Section IV" part published on a weekly basis), to the PCT Newsletter (on a monthly basis) and to the relevant National Chapters in Volume II of the PCT Applicant's Guide (the paper version of which is updated usually twice a year and the Internet version of which is updated usually on a weekly basis). Finally, a cumulative table of all applicable time limits for entering the national phase is available from WIPO's Internet site, via links from various pages the site including those of the Gazette, Newsletter and Guide, at http://www.wipo.int/pct/en/index.html.

Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in the PCT Applicant's Guide, Volume I/A, Chapter IX. Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within the time limit which is reasonable under the circumstances (Rule 17.1(c)).

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit (and all other PCT time limits) is the filing date of the earliest application whose priority is claimed (Article 2(xi)(b)).

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
20, rue de Chazelles
Cedex 17
F-75847 Paris
France

ARRIVE LE

Date of mailing (day/month/year) 21 June 2005 (21.06.2005)	
Applicant's or agent's file reference 347115 D19919	**IMPORTANT NOTIFICATION**
International application No. PCT/IB2004/004360	International filing date (day/month/year) 16 December 2004 (16.12.2004)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 16 December 2003 (16.12.2003)
Applicant PIERRE FABRE MEDICAMENT et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

3. (If applicable) An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
16 Dece 2003 (16.12.2003)	10/735,916	US	10 June 2005 (10.06.2005)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Fabienne SOCIÉ (Fax : 4122 338 70 60)
Facsimile No. (41-22) 338.70.60	Telephone No. (41-22) 338 9176

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference *(if desired) (12 characters maximum)* 347115 D19919

Box No. I TITLE OF INVENTION NOVEL ANTI-INSULIN/IGF-I HYBRID RECEPTOR OR ANTI-INSULIN/IGF-I HYBRID RECEPTOR AND IGF-IR ANTIBODIES AND USES THEREOF

Box No. II APPLICANT ☐ This person is also inventor

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

PIERRE FABRE MEDICAMENT
45, Place Abel Gance
92100 BOULOGNE BILLANCOURT
FRANCE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: FR

State *(that is, country)* of residence: FR

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

GOETSCH Liliane
15, Route de Cluses
74130 AYZE
FRANCE

This person is:
☐ applicant only
☒ applicant and inventor
☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: FR

State *(that is, country)* of residence: FR

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: ☒ agent ☐ common representative

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*

MARTIN Jean-Jacques, SCHRIMPF Robert,
WARCOIN Jacques, AHNER Francis, TEXIER Christian,
LE FORESTIER Eric,CALLON DE LAMARCK Jean-Robert
CABINET REGIMBEAU
20, rue de Chazelles
75847 PARIS CEDEX 17 - FRANCE

Telephone No. (33) 1 44 29 35 00

Facsimile No. (33) 1 44 29 35 99

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office

☐ **Address for correspondence:** Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

CORVAIA Nathalie
Résidence Les Chênes
2, rue des Chênes
74160 ARCHAMPS
FRANCE

This person is:
- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: FR

State *(that is, country)* of residence: FR

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

DUFLOS Alain
7, rue Emile Caraguel
81290 LABRUGUIERE
FRANCE

This person is:
- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: FR

State *(that is, country)* of residence: FR

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

HAEUW Jean-François
La Rose des Vents
2, Place de la Libération
74160 ST JULIEN EN GENEVOIS
FRANCE

This person is:
- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: FR

State *(that is, country)* of residence: FR

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

LEGER Olivier
22, rue Marc Courriard
74100 ANNEMASSE
FRANCE

This person is:
- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: FR

State *(that is, country)* of residence: FR

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

524

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

BECK Alain
503, Route du Poirier à l'Ane
74160 COLLONGES SOUS SALEVE
FRANCE

This person is:
- ☐ applicant only
- ☒ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality: FR

State *(that is, country)* of residence: FR

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

---

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

This person is:
- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

---

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

This person is:
- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

---

Name and address: *(Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)*

This person is:
- ☐ applicant only
- ☐ applicant and inventor
- ☐ inventor only *(If this check-box is marked, do not fill in below.)*

Applicant's registration No. with the Office

State *(that is, country)* of nationality:

State *(that is, country)* of residence:

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

---

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Box No. V DESIGNATIONS

The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.

However,

☐ DE Germany is not designated for any kind of national protection

☐ KR Republic of Korea is not designated for any kind of national protection

☐ RU Russian Federation is not designated for any kind of national protection

(The check-boxes above may be used to exclude (irrevocably) the designations concerned in order to avoid the ceasing of the effect, under the national law, of an earlier national application from which priority is claimed. See the Notes to Box No. V as to the consequences of such national law provisions in these and certain other States.)

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:

Filing date of earlier application *(day/month/year)*	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country or Member of WTO	regional application:* regional Office	international application: receiving Office
item (1) 16/12/2003 DECEMBER 16, 2003	10/735,916	US		
item (2)				
item (3)				

☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) *(only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office)* identified above as:

☐ all items ☐ item (1) ☐ item (2) ☐ item (3) ☐ other, see Supplemental Box

* *Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)):* ....

.....

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) *(if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used)*:

ISA / EPO.....

Request to use results of earlier search; reference to that search *(if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority)*:

Date *(day/month/year)* Number Country *(or regional Office)*

Box No. VIII DECLARATIONS

The following declarations are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration)*:			Number of declarations
☐ Box No. VIII (i)	Declaration as to the identity of the inventor	:	
☒ Box No. VIII (ii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	:	1
☒ Box No. VIII (iii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	:	1
☐ Box No. VIII (iv)	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	:	
☐ Box No. VIII (v)	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	:	

526
526

Box No. VIII (ii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO APPLY FOR AND BE GRANTED A PATENT

The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 212; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (ii). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51*bis*.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate:

In relation to this International Application,

PIERRE FABRE MEDICAMENT is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following :

an assignment from GOETSCH Liliane, CORVAIA Nathalie, DUFLOS Alain, HAEUW Jean-François, LEGER Olivier and BECK Alain, dated April 14, 2004

This declaration is made for the purposes of all designations, except the designation of the United States of America.

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (ii)".

Box No. VIII (iii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO CLAIM PRIORITY

The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 213; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (iii). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51*bis*.1(a)(iii)):

In relation to this International Application,

PIERRE FABRE MEDICAMENT is entitled to claim U.S. priority of earlier application no. 10/735,916 of December 16, 2003 by virtue of the following :

an assignment from GOETSCH Liliane, CORVAIA Nathalie, DUFLOS Alain, HAEUW Jean-François, LEGER Olivier and BECK Alain, dated April 14, 2004

This declaration is made for the purposes of all designations.

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (iii)".

S22
S28

Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains:

(a) In paper form, the following number of sheets:

request (including declaration sheets)	:	7
description (excluding sequence listing and/or tables related thereto)	:	138
claims	:	11
abstract	:	1
drawings	:	46
Sub-total number of sheets	:	203
sequence listing	:	42
tables related thereto	:	
(for both, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form; see (c) below)		
Total number of sheets	:	245

(b) ☐ only in computer readable form (Section 801(a)(i))
- (i) ☐ sequence listing
- (ii) ☐ tables related thereto

(c) ☐ also in computer readable form (Section 801(a)(ii))
- (i) ☐ sequence listing
- (ii) ☐ tables related thereto

Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the
- ☐ sequence listing: .....
- ☐ tables related thereto: .....

(additional copies to be indicated under items 9(ii) and/or 10(ii), in right column)

This international application is accompanied by the following item(s) *(mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item)*: — Number of items

1. ☒ fee calculation sheet (in duplicate) : 1
2. ☐ original separate power of attorney to follow : 2 :
3. ☐ original general power of attorney :
4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any: ..... :
5. ☐ statement explaining lack of signature :
6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): 1. to follow ..... :
7. ☐ translation of international application into *(language)*: ..... :
8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material :
9. ☒ sequence listing in computer readable form *(indicate type and number of carriers)*
   - (i) ☒ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13*ter* only (and not as part of the international application) : 1
   - (ii) ☐ *(only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13*ter* :
   - (iii) ☒ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column : 1
10. ☐ tables in computer readable form related to sequence listing *(indicate type and number of carriers)*
    - (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-*quater*) only (and not as part of the international application) :
    - (ii) ☐ *(only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column)* additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-*quater*) :
    - (iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column :
11. ☐ other *(specify)*: ..... :

Figure of the drawings which should accompany the abstract:

Language of filing of the international application: English

Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).

AHNER Francis

CABINET REGIMBEAU
CONSEILS EN PROPRIETE INDUSTRIELLE
20, rue de Chazelles
75847 PARIS CEDEX 17 FRANCE
Tél. : 01 44 29 35 00
Fax : 01 44 29 35 99

For receiving Office use only

1. Date of actual receipt of the purported international application:
2. Drawings: ☐ received: ☐ not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /
6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

Brigard & Castro

BOGOTA - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros) PIERRE FABRE MEDICAMENT

domiciliado(a) en 45, place Abel Gance
92100 BOULOGNE-BILLANCOURT
FRANCE

Nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA**, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseñas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(a) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO y/o BEATRIZ JARAMILLO y/o CARLOS H. PALACIO EASTMAN y/o HECTOR GOMEZ MEJIA,,** domiciliado(a) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de 200_

Firma

Nombre
Cargo

PIERRE FABRE MEDICAMENT
Société Anonyme
17, avenue Jean Moulin - 81106 CASTRES
45, place Abel Gance - 92100 BOULOGNE

Vu pour légalisation de la signature de M. Jean-Pierre COUZINIER
A CASTRES, le 5 SEP. 2005
Pour le Président de la CCI de CASTRES-MAZAMET
Françoise SEGUR

POWER OF ATTORNEY

I (we) PIERRE FABRE MEDICAMENT

domiciled in 45, place Abel Gance
92100 BOULOGNE-BILLANCOURT
FRANCE

Hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **BEATRIZ JARAMILLO** and/or **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** and/or **HECTOR GOMEZ MEJIA**, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages; claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotes and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **BEATRIZ JARAMILLO** and/or **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** and/or **HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciled in Carrera 7 No. 16-56, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Granted and signed in Castres

this 26th day of July 2005

Signature

Name Jean-Pierre COUZINIER
Title : Chief Operating Officer

NOVEL ANTI-IGF-IR ANTIBODIES AND USES THEREOF

COMO NOTARIO CUARENTA Y SEIS DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE ESTA FOTOSTATICA CONCUERDA CON ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
26 OCT 2005
OSCAR ALARCON NUÑEZ
NOTARIO CUARENTA Y SEIS

530
530

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy de de
personalmente compareció ante mí

a quien conozco, y de quien me consta que firmó el anterior documento, debidamente juramentado declaró y dijo que él (ella) es

de

Sociedad legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado; que el declarante está autorizado por dicha compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y representación de la expresada compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del objeto social de la sociedad.

El suscrito Notario hace constar que tuvo a la vista las pruebas de la existencia de la sociedad.

Estado de
con fecha

y que quien confiere el presente poder es su representante.

Notario Público (sello)

CERTIFICADO NOTARIAL
PERSONA NATURAL

Hoy de de , compareció(eron)
ante mí

a quien (es) conozco y me consta que es(son) la(s) persona(s) firmante(s) del documento que precede y quien(es) declara(n) que otorgan el mismo para los fines y propósitos que en él se expresan.

Notario Público (sello)

LEGALIZACION POR APOSTILLA ES REQUERIDA.

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 26th day of July of 2005
personally appeared before me
Jean-Pierre COUZINIER
to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument who being by me duly sworn did depose and say that he (she) is the

Chief Operating Officer

of PIERRE FABRE MEDICAMENT

Which is legally constituted for a term not yet expired, that deponent is authorized by said Company to confer this Power of Attorney: that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purpose of company.

The undersigned Notary Public attests that he has seen the documents that prove the existance of the company.

State of France
under date of France

and that he (she) who grants the present power of attorney is its Representative.

Me Philippe DEYVEAUX, NOTAIRE
81100 CASTRES

Notary Public (Seal)

NOTARIAL CERTIFICATE
NATURAL PERSON

On this day of of
personally appeared before me

who is(are) known to me and who I attest executed the foregoing document and he (they) declared he (they) executed the document for the purposes therein

A CASTRES, le 5 SEP. 2005
Pour le Président de la CCI de
CASTRES-MAZAMET
François SEGUR

Notary Public (Seal)

LEGALIZATION BY APOSTILLE IS REQUIRED

CUARENTA Y SEIS DEL CIRCULO HAGO CONSTAR QUE LA FOTOSTATICA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
REPUBLICA DE COLOMBIA
26 OCT 2005
OSCAR ALARCON NUÑEZ
NOTARIO CUARENTA Y SEIS

[redacted]

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1 - République Française

Le présent acte public
2 - a été signé par..... FACTEUR
3 - agissant en qualité de..... PERSONNEL
4 - est revêtu du sceau de..... SNCF

Atteste

5 - à TOULOUSE 6 - le - 9 SEP. 2005
7 - Par le procureur général près la cour d'appel
8 - Sous n°.....
9 - Sceau 10 - Signature

PARQUET GENERAL

26 OCT 2005

OSCAR ALARCON NUÑEZ

98448

531

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Poder otorgado por **PIERRE FABRE MEDICAMENT**, domiciliada en **45, place Abel Gance, 92100 Boulogne-Billancourt, Francia.**

En anverso del Documento de Poder hay un sello que dice:

Visto para la certificación de la firma de:
Sr. Jean-Pierre COUZNIER
En CASTRES el 5 de septiembre de 2005
Por el Presidente de la CCI de
CASTRES-MAZAMET
François SEGUR

[Sello] CAMARA de COMERCIO e INDUSTRIA de CASTRES-MAZAMET

En el anverso del Certificado Notarial (Sociedad) hay un sello que dice:

Sr. Philippe DEYVAUX, NOTARIO
81100 CASTRES

Hay otro sello que dice:

Visto para la certificación de la firma de:
Sr. Philippe DEYVAUX
En CASTRES el 5 de septiembre de 2005
Por el Presidente de la CCI de
CASTRES-MAZAMET
François SEGUR

[Sello] CAMARA de COMERCIO e INDUSTRIA de CASTRES-MAZAMET



532

En el reverso del Certificado Notarial (Sociedad) hay un sello que dice:

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

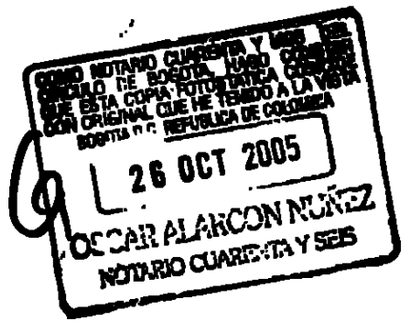
1. República Francesa

El presente documento público

2. ha sido firmado por F. SEGUR
3. firmando en calidad de Presidente
4. lleva el Sello/Timbre de CCI Castres-Mazamet

Certificado

5. en TOULOUSE
6. el 9 de septiembre de 2005
7. por el procurador general de la corte de apelaciones
8. Bajo el no. 6293
9. Sello
10. Firma



TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Poder otorgado por **PIERRE FABRE MEDICAMENT** domiciliada en **45, place Abel ance, 92100 Boulogne-Billancourt, Francia.**

En anverso del Documento de Poder hay un sello que dice:

Visto para la certificación de la firma de:
Sr. Jean-Pierre COUZNIER
En CASTRES el 5 de septiembre de 2005
Por el Presidente de la CCI de
CASTRES-MAZAMET
François SEGUR

[Sello] CAMARA de COMERCIO e INDUSTRIA de CASTRES-MAZAMET

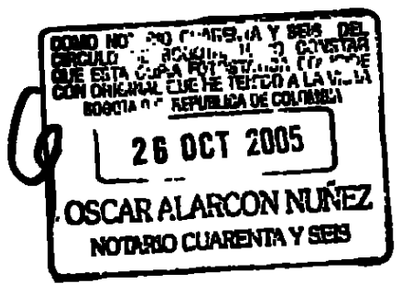
En el anverso del Certificado Notarial (Sociedad) hay un sello que dice:

Sr. Philippe DEYVAUX, NOTARIO
81100 CASTRES

Hay otro sello que dice:

Visto para la certificación de la firma de:
Sr. Philippe DEYVAUX
En CASTRES el 5 de septiembre de 2005
Por el Presidente de la CCI de
CASTRES-MAZAMET
François SEGUR

[Sello] CAMARA de COMERCIO e INDUSTRIA de CASTRES-MAZAMET



534

En el reverso del Certificado Notarial (Sociedad) hay un sello que dice:

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

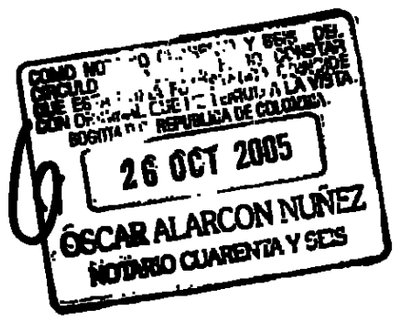
1. República Francesa

El presente documento público

2. ha sido firmado por F. SEGUR
3. firmando en calidad de Presidente
4. lleva el Sello/Timbre de CCI Castres-Mazamet

Certificado

5. en TOULOUSE
6. el 9 de septiembre de 2005
7. por el procurador general de la corte de apelaciones
8. Bajo el no. 6293
9. Sello
10. Firma



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad 06-068312 -00000-0000
Fec. 2006-07 13 17.44 22 Dep 2020 NUECREACIONES
Tra. 1 PATENTEIYII
Cve 378 FASENACIONALI
Act 41 PRESENTACION Folios 994

SSS

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION [1] MODELO DE UTILIDAD [ ]

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [1]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [1]
- Descripción de la invencion [1]
- Dibujos de ser estos pertinentes [1]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [1]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial [ ]
- Datos de identificacion del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica y fotografica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

ESQUEMA DE TRAZADO [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Firma Responsable

Fecha 13 JUL 2006

Carrera 13 No 27-00 Piso 5 7 y 10
Conmutador 3 82 08 40
Fax 350 52 20
E mail info@sic gov co
www sic gov co
Bogotá D C Colombia

536

REPUBLICA DE COLOMBIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCI

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO
Apoderado(a) y/o Representante de
PIERRE FABRE MEDICAMENT

REFERENCIA	Radicación No.	6 68312
	Solicitud internacional	IB2004/004360
	Fecha inicio fase nacional	16/07/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	10198

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 08 SET. 2006
adpal