



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 454**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 5/16 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08007731 .6**

96 Fecha de presentación : **09.07.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1959014**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.08.2008**

54

Título: **Anticuerpos contra el receptor del factor I de crecimiento similar a insulina y usos de los mismos.**

30

Prioridad: **10.07.2003 EP 03015526**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.06.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.06.2011

73

Titular/es: **F. Hoffmann-La Roche Ag**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72

Inventor/es: **Graus, Yvo;**
Kopetzki, Erhard;
Kuenkele, Klaus-Peter;
Mundigl, Olaf;
Parren, Paul;
Rebers, Frank;
Schumacher, Ralf;
Van de Winkel, Jan y
Van Vugt, Martine

74

Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 360 454 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra el receptor del factor I de crecimiento similar a insulina y usos de los mismos

- 5 La presente invención se refiere a anticuerpos contra el receptor del factor I similar a insulina (IGF-1R), a métodos para su producción, a composiciones farmacéuticas que contienen dichos anticuerpos y a usos de los mismos.
- El factor I de crecimiento similar a la insulina (IGF-1R, EC 2.7.112, antígeno CD221) pertenece a la familia de las proteínas tirosina quinasa transmembranales (LeiRoith D. *et al.*, *Endocrin. Rev.* 16:143-163, 1995, y Adams T.E. *et al.*, *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1050-1063). El IGF-1R se une a IGF-1 con elevada afinidad e inicia la respuesta fisiológica frente a dicho ligando *in vivo*. IGF-1R también se une a IGF-2, sin embargo con una afinidad ligeramente inferior. La sobreexpresión de IGF-1R estimula la transformación neoplásica de las células y existe evidencia de que IGF-1R se encuentra implicado en la transformación maligna de las células y por lo tanto de que es una diana útil para el desarrollo de agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer (Adams *et al.*, *Cell Mol. Life Sci.* 57:1050-1093, 2000). 57 (2000) 1050-1063).
- Los anticuerpos contra IGF-1R son bien conocidos del estado de la técnica y han sido investigados por sus efectos antitumorales *in vitro* e *in vivo* (Benini S. *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 7:1790-1797, 2001; Scotlandi K. *et al.*, *Cancer Gene Ther.* 9:296-307, 2002; Scotlandi K. *et al.*, *Int. J. Cancer* 101:11-16, 2002; Brunetti A. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165:212-218, 1989; Prigent S.A. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265:9970-9977, 1990; Li S.L. *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 49:243-252, 2000; Pessino A. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162:1236-1243, 1989; Surinya K.H. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277:16718-16725, 2002; Soos M.A. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267:12955-12963, 1992; Soos M.A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5217-5221, 1989; O'Brien R.M. *et al.*, *EMBO J.* 6:4003-4010, 1987; Taylor R. *et al.*, *Biochem. J.* 242:123-129, 1987; Soos M.A. *et al.*, *Biochem. J.* 235:199-208, 1986; Li S.L. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:92-98, 1993; Delafontaine P. *et al.*, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 26:1659-1673, 1994; Kull F.C. Jr. *et al.* *J. Biol. Chem.* 258:6561-6566, 1983; Morgan D.O. y Roth R.A., *Biochemistry* 25:1364-1371, 1986; Forsayeth J.R. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3448-3451, 1987; Schaefer E.M. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265:13248-13253, 1990; Gustafson T.A. y Rutter W.J., *J. Biol. Chem.* 265:18663-18667, 1990; Hoyne P.A. *et al.*, *FEBS Lett.* 469:57-60, 2000; Tulloch P.A. *et al.*, *J. Struct. Biol.* 125:11-18, 1999; Rohlik Q.T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149:276-281, 149; y Kalebic T. *et al.*, *Cancer Res.* 54:5531-5534, 1994; Adams T.E. *et al.*, *Cell. Mol. Life Sci.* 57:1050-1063, 2000; Dricu A. *et al.*, *Glycobiology* 9:571-579, 1999; Kanter-Lewensohn L. *et al.*, *Melanoma Res.* 8:389-397, 1998; Li S.L. *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 49:243-252, 2000). Los anticuerpos contra IGF-1R también se describen en gran cantidad de publicaciones adicionales, por ejemplo Arteaga C.L. *et al.*, *Breast Cancer Res. Treatment* 22:101-106, 1992; y Hailey J. *et al.*, *Mol. Cancer Ther.* 1:1349-1353, 2002.
- En particular, el anticuerpo monoclonal contra IGF-1R denominado α IR3 se utiliza ampliamente en la investigación de los procesos mediados por IGF-1R y de las enfermedades mediadas por IGF-1R tales como el cáncer. Alfa-IR3 también ha sido descrito por Kull F.C., *J. Biol. Chem.* 258:6561-6566, 258. Desde entonces se han publicado aproximadamente cien publicaciones referidas a la investigación y al uso terapéutico de α IR3 con respecto a su efecto antitumoral, solo o conjuntamente con agentes citostáticos tales como la doxorrubicina y la vincristina. α IR3 es un anticuerpo monoclonal murino que es conocido que inhibe la unión de IGF-1 al receptor de IGF pero no la unión de IGF-2 a IGF-1R. α IR3 estimula a concentraciones elevadas la proliferación de las células tumorales y la fosforilación de IGF-1R (Bergmann U. *et al.*, *Cancer Res.* 55:2007-2011, 1995; Kato H. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 268:2655-2661, 1993). Existen otros anticuerpos (por ejemplo 1H7, Li S.L. *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 49:243-252, 2000) que inhiben la unión de IGF-2 a IGF-1R más potentemente que la unión de IGF-1. Un resumen del estado de la técnica de los anticuerpos y de sus propiedades y características se describe en Adams T.E. *et al.*, *Cell. Mol. Life Sci.* 57:1050-1063, 2000.
- La mayoría de los anticuerpos descritos en el estado de la técnica se obtiene del ratón. Dichos anticuerpos no resultan útiles, tal como es bien conocido del estado de la técnica, para la terapia de pacientes humanos sin alteraciones adicionales tales como la quimerización o la humanización Basándose en estas desventajas, los anticuerpos humanos resultan claramente preferentes como agentes terapéuticos en el tratamiento de los pacientes humanos. Los anticuerpos humanos son bien conocidos en el estado de la técnica (van Dijk M.A. y van de Winkel J.G., *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-374, 2001). Basándose en dicha tecnología, pueden producirse anticuerpos humanos contra una gran diversidad de dianas. Se describen ejemplos de anticuerpos humanos contra IGF-1R en la patente WO n° 02/053596, que muestran, sin embargo, actividad agonista.
- Sin embargo, todavía existe una necesidad de anticuerpos contra IGF-1R con beneficios convincentes para los pacientes que necesitan terapia antitumoral. El beneficio relevante para el paciente es, en términos sencillos, la reducción del crecimiento tumoral y una prolongación significativa del tiempo hasta la progresión causada por el tratamiento con el agente antitumorígeno.

Descripción resumida de la invención

La invención proporciona anticuerpos que se unen al IGF-1R humano que comprenden como agentes determinantes de complementariedad (CDRs) las secuencias siguientes: a) una cadena pesada de anticuerpo que comprende como CDRs, la CDR1 de aminoácidos 31 a 35, la CDR2 de aminoácidos 50 a 66 y la CDR3 de aminoácidos 99 a 107 de la secuencia SEC ID nº 1, y una cadena ligera de anticuerpo que comprende como CDRs, la CDR1 de aminoácidos 24 a 34, la CDR2 de aminoácidos 50 a 56 y la CDR3 de aminoácidos 89 a 98 de la secuencia SEC ID nº 2, o b) una cadena pesada de anticuerpo que comprende como CDRs, la CDR1 de aminoácidos 31 a 35, la CDR2 de aminoácidos 50 a 66 y la CDR3 de aminoácidos 99 a 107 de la secuencia SEC ID nº 3, y una cadena ligera de anticuerpo que comprende como CDRs, la CDR1 de aminoácidos 24 a 34, la CDR2 de aminoácidos 50 a 56 y la CDR3 de aminoácidos 89 a 98 de la secuencia SEC ID nº 4.

Un anticuerpo según la invención se une a IGF-1R, inhibiendo la unión de IGF-1 e IGF-2 a IGF-1R, es del isotipo IgG1, muestra una proporción entre los valores de IC₅₀ de inhibición de la unión de IGF-1 a IGF-1R y de inhibición de la unión de IGF-2 a IGF-1R, de entre 1:3 y 3:1, inhibe por lo menos 80%, preferentemente por lo menos 90%, a una concentración de 5 nM, la fosforilación de IGF-1R en un ensayo celular de fosforilación con células HT29 en un medio que contiene 0,5% de suero de feto bovino inactivado por calor (FCS) en comparación con dicho ensayo sin dicho anticuerpo, y no muestra actividad estimuladora de IGF-1R medida como fosforilación de PKB a una concentración de 10 µM en un ensayo celular de fosforilación con células 3T3 que proporciona entre 400.000 y 600.000 moléculas de IGF-1R por célula en un medio que contiene 0,5% de suero de feto bovino (FCS) inactivado por calor en comparación con dicho ensayo sin dicho anticuerpo.

Los anticuerpos según la invención muestran ventajas para los pacientes que necesitan terapia antitumoral y proporcionan una reducción del crecimiento tumoral y una prolongación significativa del tiempo hasta la progresión. Los anticuerpos según la invención presentan nuevas propiedades inventivas que causan un beneficio para un paciente que sufre una enfermedad asociada a una desregulación de IGF, especialmente una enfermedad tumoral. Los anticuerpos según la invención se caracterizan por las propiedades anteriormente indicadas. Por lo tanto, las propiedades son especialmente la unión específica a IGF-1R, la inhibición de la unión de IGF-1 e IGF-2 a IGF-1R en la proporción anteriormente indicada, siendo del isotipo IgG1, y la no activación de la señalización de IGF-1R incluso en células que sobreexpresaban IGF-1R a una concentración de 200 veces su valor de IC₅₀. Los anticuerpos que no presentan "actividad mimética de IGF-1" proporcionan una fuerte ventaja al utilizarse como agente terapéutico.

Preferentemente, un anticuerpo según la invención induce, además, la muerte celular de 20% o más de las células de una preparación de células que expresan IGF-1R tras 24 horas a una concentración de dicho anticuerpo de 100 nM, mediante ADCC.

Preferentemente, además, los anticuerpos según la invención inducen la muerte celular de 20% o más de las células de una preparación de células que expresan IGF-1R tras 4 horas a una concentración de anticuerpos de 100 nM, mediante CDC. Preferentemente, a una concentración de 5 nM, los anticuerpos según la invención inhiben por completo la transducción de señales mediada por IGF-1 de IGF-1R en células tumorales.

La invención también comprende un ácido nucleico codificante de un anticuerpo que se une a IGF-1R, caracterizado porque comprende: a) una cadena pesada de anticuerpo que comprende como CDRs, la CDR1 (aminoácidos 31 a 35), la CDR2 (aminoácidos 50 a 66), y la CDR3 (aminoácidos 99 a 107) de la secuencia SEC ID nº 1 ó 3, b) una cadena ligera de anticuerpo que comprende como CDRs, la CDR1 (aminoácidos 24 a 34), la CDR2 (aminoácidos 50 a 56) y la CDR3 (aminoácidos 89 a 98) de secuencia SEC ID nº 2 ó 4.

El anticuerpo preferentemente es un anticuerpo monoclonal y, además, un anticuerpo quimérico (cadena constante humana), un anticuerpo humanizado y con especial preferencia, un anticuerpo humano.

El anticuerpo se une al IGF-1R humano (EC 2.7.1.112, SwissProt P08069) en competición con el anticuerpo 18.

El anticuerpo se caracteriza adicionalmente por una afinidad de 10⁻⁸ M (K_D) o inferior, preferentemente de entre aproximadamente 10⁻⁹ y 10⁻¹³ M.

El anticuerpo preferentemente no muestra inhibición detectable dependiente de la concentración de la unión de la insulina al receptor de insulina.

El anticuerpo preferentemente es del tipo IgG1 y por lo tanto proporciona unión del complemento C1q e induce la CDC.

El anticuerpo se caracteriza adicionalmente por su capacidad de unirse al receptor de Fc IgG y de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

5 El anticuerpo según la invención prolonga considerablemente el tiempo hasta la progresión en modelos de xenoinjerto tumoral relevantes en comparación con animales tratados con vehículo y reduce el crecimiento tumoral. El anticuerpo inhibe la unión de IGF-1 e IGF-2 a IGF-1R *in vitro* e *in vivo*, preferentemente de modo aproximadamente igual para IGF-1 e IGF-2.

10 La invención proporciona además líneas celulares de hibridoma que producen dicho anticuerpos monoclonales antagonistas según la invención.

15 Las líneas celulares de hibridoma preferentes según la invención, <IGF-1R> HUMAB clon 18 (anticuerpo 18) e <IGF-1R> HUMAB clon 22 (anticuerpo 22) han sido depositadas en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Alemania.

Línea celular	Nº de depósito	Fecha de depósito
<IGF-1R> HUMAB-clon 18	DSM ACC 2587	10.04.2003
<IGF-1R> HUMAB-clon 22	DSM ACC 2594	09.05.2003

Los anticuerpos obtenibles de dichas líneas celulares son realizaciones preferentes de la invención.

20 La invención proporciona además ácidos nucleicos codificantes de dichos anticuerpos, vectores de expresión que contienen dichos ácidos nucleicos y células huésped para la producción recombinante de dichos anticuerpos.

La invención proporciona además métodos para la producción recombinante de dichos anticuerpos.

25 La invención resulta útil para el tratamiento del cáncer, comprendiendo la administración en un paciente que se ha diagnosticado que presenta cáncer (y por lo tanto que requiere una terapia antitumoral) de una cantidad efectiva de un anticuerpo antagonista contra IGF-1R según la invención.

30 El anticuerpo puede administrarse solo, en una composición farmacéutica, o alternativamente en combinación con un tratamiento citotóxico, tal como la radioterapia o un agente citotóxico o un profármaco del mismo.

La invención comprende además la utilización de un anticuerpo según la invención para el tratamiento del cáncer y para la preparación de una composición farmacéutica según la invención. Además, la invención comprende un método para la preparación de una composición farmacéutica según la invención.

35 La invención comprende además una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo según la invención con una cantidad farmacéuticamente efectiva, opcionalmente conjuntamente con un tampón y/o un adyuvante útiles para la formulación de anticuerpos con fines farmacéuticos.

40 La invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden dichos anticuerpos en un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica puede incluirse en un artículo manufacturado o kit.

45 La invención comprende además un vector que contiene un ácido nucleico según la invención, capaz de expresar dicho ácido nucleico en una célula huésped procariótica o eucariótica.

La invención comprende además una célula huésped procariótica o eucariótica que comprende un vector según la invención.

50 La invención comprende además un método para la producción de un anticuerpo humano recombinante según la invención, caracterizado porque se expresa un ácido nucleico según la invención en una célula huésped procariótica o eucariótica y recuperar dicho anticuerpo a partir de dicha célula. La invención comprende además el anticuerpo obtenible mediante dicho método recombinante.

5 Resulta útil para la invención un método para la selección de un anticuerpo contra IGF-1R de entre una pluralidad de anticuerpos contra IGF-1R caracterizada porque un ensayo celular de fosforilación con células 3T3 que proporciona entre 400.000 y 600.000 moléculas de IGF-1R por cada célula en un medio que contiene 0,5% de suero de feto bovino (FCS) inactivado por calor, se lleva a cabo con dichos anticuerpos y se selecciona dicho anticuerpo que no muestra

10 ninguna actividad estimuladora de IGF-1R medida como fosforilación de PKB a una concentración de 10 μ M en comparación con dicho ensayo sin dicho anticuerpo. Preferentemente el anticuerpo presenta una o más de las propiedades adicionales anteriormente indicadas.

15 Resulta útil para la invención un método para la preparación de una composición farmacéutica caracterizada por la selección de un anticuerpo contra IGF-1R de entre una pluralidad de anticuerpos contra IGF-1R, la realización de un ensayo celular de fosforilación con células 3T3 que proporciona entre 400.000 y 600.000 moléculas de IGF-1R por cada célula en un medio que contiene 0,5% de suero de feto bovino (FCS) inactivado por calor con dichos anticuerpos y la selección de dicho anticuerpo, que no muestra ninguna actividad estimuladora de IGF-1R medida como fosforilación de PKB a una concentración de 10 μ m en comparación con dicho ensayo sin dicho anticuerpo, la producción de dicho anticuerpo medio de la expresión recombinante, la recuperación de dicho anticuerpo y la combinación de dicho anticuerpo con un tampón y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. Preferentemente el anticuerpo presenta una o más de las propiedades adicionales anteriormente indicadas.

20 Descripción detallada de la invención

20 El término "anticuerpo" comprende las diversas formas de anticuerpos, incluyendo, aunque sin limitación, anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos manipulados genéticamente, con la condición de que se conserven las propiedades características según la invención.

25 La expresión "fragmentos de anticuerpo" comprende una parte de un anticuerpo de longitud completa, generalmente por lo menos la parte ligante de antígeno o la región variable del mismo. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen diácuerpos, moléculas de anticuerpo monocatenarios, inmunotoxinas y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Además, los fragmentos de anticuerpo comprenden polipéptidos monocatenarios que presentan las características de una cadena VH, es decir son capaces de ensamblarse con una cadena VL, o de una

30 cadena VL que se une a IGF-1R, es decir que son capaces de ensamblarse, conjuntamente con una cadena VH, con un bolsillo de unión a antígeno funcional y proporcionar de esta manera la propiedad de inhibir la unión de IGF-1 e IGF-2 a IGF-1R.

35 La expresión "fragmentos de anticuerpo" también comprende dichos fragmentos, que por sí solos no son capaces de proporcionar funciones efectoras (ADCC/CDC) pero que proporcionan dicha función de un modo según la invención tras combinarse con uno o más dominios constantes de anticuerpo apropiados.

40 Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpos monoclonales" tal como se utilizan en la presente memoria se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de una única composición de aminoácidos. Por consiguiente, la expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una única especificidad de unión que presentan regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, por ejemplo de un ratón transgénico, que presenta un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana fusionados a una célula inmortalizada.

45

50 La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable, es decir una región de unión, de una fuente o especie y por lo menos una parte de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, habitualmente preparado mediante técnicas de ADN recombinante. Los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable murina y una región constante humana resultan especialmente preferentes. Dichos anticuerpos quiméricos murinos/humanos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de ADN codificantes de regiones variables de inmunoglobulina murina y segmentos de ADN codificantes de regiones constantes de inmunoglobulina humana. Otras formas de "anticuerpos quiméricos" comprendidos por la presente invención son aquéllas en las que la clase o subclase ha sido modificada o cambiada respecto a la del anticuerpo original. Dichos anticuerpos "quiméricos" también se denominan "anticuerpos de cambio de clase". Los métodos para producir anticuerpos quiméricos implican técnicas convencionales de ADN recombinante y de transfección génica ahora bien conocidas de la técnica (ver, por ejemplo, Morrison S.L. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855, 1984; patentes US nº 5.202.238 y nº 5.204.244).

55

60 La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que la región marco o las "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) han sido modificadas para que comprendan la CDR de una inmunoglobulina de

especificidad diferente de la de la inmunoglobulina parental. En una realización preferente, se injerta una CDR murina en la región marco de un anticuerpo humano para preparar un "anticuerpo humanizado". Ver, por ejemplo, Riechmann, L. *et al.*, Nature 332:323-327, 1988, y Neuberger, M.S. *et al.*, Nature 314:268-270, 1985.

- 5 Las CDRs particularmente preferentes corresponden a aquéllas que representan secuencias que reconocen los antígenos indicados anteriormente para los anticuerpos quiméricos y bifuncionales.

La expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir anticuerpos que presentan regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. La cadena pesada variable preferentemente se deriva de la secuencia de línea germinal DP-50 (GenBank nº L06618) y la cadena ligera variable preferentemente se deriva de la secuencia de línea germinal L6 (GenBank nº X01668). Las regiones constantes del anticuerpo son regiones constantes de tipo IgG1 humano. Dichas regiones pueden ser alotípicas y se describen en, por ejemplo, Johnson G. y Wu T.T., Nucleic Acids Res. 28:214-218, 2000, y las bases de datos referenciadas en las mismas, y resultan útiles con la condición de que las propiedades de inducción de la ADCC, y preferentemente de la CDC según la invención, se conserven.

La expresión "anticuerpo recombinante humano", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados de una célula huésped, tal como una célula SP2-0, NS0 o CHO, o de un animal (por ejemplo un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana o para anticuerpos expresados utilizando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped. Dichos anticuerpos humanos recombinantes presentan regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana en una forma reorganizada. Los anticuerpos recombinantes humanos según la invención han sido sometidos a hipermutación somática *in vivo*. De esta manera, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de las secuencias VH y VL de la línea germinal humana y relacionadas con la misma, podrían no existir naturalmente en el repertorio *in vivo* de anticuerpos de la línea germinal humana.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "unión" se refiere a la unión de anticuerpos a IGF-1R con una afinidad de entre aproximadamente 10^{-13} y 10^{-8} M (K_D), preferentemente de entre aproximadamente 10^{-13} y 10^{-9} M.

La expresión "molécula de ácidos nucleicos", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácidos nucleicos puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es de ADN bicatenario.

Los "dominios constantes" no se encuentran implicados directamente en la unión del anticuerpo a un antígeno, aunque se encuentran implicados en las funciones efectoras (ADCC, unión del complemento, y CDC). El dominio constante de un anticuerpo según la invención es del tipo IgG1. Se informa en detalle de regiones constantes humanas que presentan dichas características en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, y en Brüggermann, M. *et al.*, J. Exp. Med. 166:1351-1361, 1987; Love, T.W. *et al.*, Methods Enzymol. 178:515-527, 1989. Se muestran ejemplos en las secuencias SEC ID nº 5 a 8. Otros dominios constantes útiles y preferentes son los dominios constantes de los anticuerpos obtenibles a partir de las líneas celulares de hibridoma depositadas en la DSMZ para la presente invención. Los dominios constantes que resultan útiles en la invención proporcionan unión del complemento. ADCC, y opcionalmente CDC, son proporcionados por la combinación de dominios variables y constantes.

La expresión "región variable" (región variable de cadena ligera (VL), región variable de cadena pesada (VH)) tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cada una de las cadenas de la pareja de cadenas ligera y pesada que se encuentra implicada directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios de las cadenas variables ligeras y pesadas humanas presentan la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR) cuyas secuencias se encuentran ampliamente conservadas y conectadas por tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de complementariedad, CDRs). Las regiones de marco adoptan una conformación de hoja β y las CDRs pueden formar bucles conectando la estructura de hoja β . Las CDRs en cada cadena son mantenidas en su estructura tridimensional por las regiones de marco y forman conjuntamente con las CDRs de la otra cadena el sitio de unión de antígeno. Las regiones CDR3 de las cadenas pesada y ligera de anticuerpo desempeñan un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de los anticuerpos según la invención y, por lo tanto, proporcionan un objetivo adicional de la invención.

Las expresiones "región hipervariable" o "parte ligante de antígeno de un anticuerpo" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a los residuos aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende residuos aminoácidos de las "regiones determinantes de complementariedad" o "CDRs". Las regiones "de marco" o "FR" son aquellas regiones de dominio variable diferentes de los residuos de la región

hipervariable tal como se definen en la presente memoria. Por lo tanto, las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo comprenden, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. En particular, la CDR3 de la cadena pesada es la región que contribuye más a la unión de antígeno. Las regiones CDR y FR se determinan según la definición estándar de Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, y/o a partir de los residuos de un "bucle hipervariable".

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "de unión a IGF-1R" se refiere a la unión del anticuerpo a IGF-1R en un ensayo *in vitro*, preferentemente en un ensayo de unión en el que el anticuerpo se une a una superficie y la unión de IGF-1R se mide mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). La unión se refiere a una afinidad de unión (K_D) de 10^{-8} M o inferior, preferentemente de entre 10^{-13} y 10^{-9} M.

La unión a IGF-1R puede investigarse mediante un ensayo BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia). La afinidad de unión se define con los términos k_a (constante de velocidad para la asociación del anticuerpo del complejo de anticuerpo/antígeno), k_D (constante de disociación) y K_D (k_D/k_a). Los anticuerpos según la invención muestran una K_D de 10^{-10} M o inferior.

La unión de IGF-1 e IGF-2 a IGF-1R también resulta inhibida por los anticuerpos según la invención. La inhibición se mide como IC_{50} en un ensayo de unión de IGF-1/IGF-2 a IGF-1R en células tumorales. Dicho ensayo se describe en el Ejemplo 7. En dicho ensayo, la cantidad de IGF-1 ó IGF-2 o fragmentos de los mismos de unión a IGF-1R, marcados radioactivamente, unidos al IGF-1R proporcionado en la superficie de dichas células tumorales (por ejemplo HT29) se mide sin y con concentraciones crecientes del anticuerpo. Los valores de IC_{50} de los anticuerpos según la invención para la unión de IGF-1 e IGF-2 a IGF-1R no son superiores a 2 nM y la proporción de los valores de IC_{50} para la unión de IGF-1/IGF-2 a IGF-1R es de entre aproximadamente 1:3 y 3:1. Los valores de IC_{50} se miden como valores promedio o de mediana de por lo menos tres mediciones independientes. Algunos valores individuales de IC_{50} podrían encontrarse fuera del intervalo.

La expresión "inhibición de la unión de IGF-1 e IGF-2 a IGF-1R" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la inhibición de la unión de IGF-1 ó IGF-2 marcado con I^{125} a IGF-1R presentado sobre la superficie de células tumorales HT29 (ATCC n° HTB-38) en un ensayo *in vitro*. El término "inhibición" se refiere a un valor de IC_{50} de 2 nM o inferior.

La expresión "células que expresan IGF-1R" se refiere a aquellas células que sobreexpresan el receptor IGF-1 hasta aproximadamente por lo menos 20.000 receptores/célula. Dichas células son, por ejemplo, líneas celulares tumorales tales como NCI H322M o HT29, o una línea celular (por ejemplo 3T3, ATCC n° CRL 1658) que sobreexpresan IGF-1R tras la transfección con un vector de expresión para IGF-1R. El número de receptores en cada célula se mide según Lammers R. *et al.*, EMBO J. 8:1369-1375, 1989.

La expresión "inhibición de la fosforilación de IGF-1R" se refiere a un ensayo celular de fosforilación con células 3T3 que proporciona entre 400.000 y 600.000 moléculas de IGF-1R en cada célula en medio que contiene 0,5% de suero de feto bovino (FCS) inactivado por calor en comparación con dicho ensayo sin dicho anticuerpo. La fosforilación se detecta mediante transferencia western utilizando un anticuerpo específico para las proteínas con tirosinas fosforiladas. Dicho ensayo se describe en el Ejemplo 11. La inactivación por calor de FCS se lleva a cabo mediante el calentamiento de corto plazo a 56°C para la inactivación del sistema del complemento.

La expresión "inhibición de la fosforilación de PKB" se refiere a un ensayo celular de fosforilación con células 3T3 que proporciona entre 400.000 y 600.000 moléculas de IGF-1R en cada célula en medio que contiene 0,5% de suero de feto bovino (FCS) inactivado por calor en comparación con dicho ensayo sin dicho anticuerpo. La fosforilación se detecta mediante transferencia western utilizando un anticuerpo específico para PKB fosforilado en la serina 473 de PKB (Akt 1, Swiss Prot. n° de acceso P31749). Dicho ensayo se describe en el Ejemplo 11.

La expresión "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)" se refiere a la lisis de células diana tumorales humanas por parte de un anticuerpo según la invención en presencia de células efectoras. La ADCC se mide preferentemente mediante el tratamiento de una preparación de células que expresan IGF-1R con un anticuerpo según la invención en presencia de células efectoras, tales como PBMC recién aisladas o células efectoras purificadas a partir de capas leucoplaquetarias tales como monocitos o células NK. Se presenta la CDC en el caso de que el anticuerpo induzca a una concentración de 100 nM la lisis (la muerte celular) de 20% o más de las células tumorales tras 24 horas. En el caso de que se encuentre que la ADCC es más pronunciada a las 4 horas que a las 24 horas, la medición se realiza a las 4 horas. El ensayo se lleva a cabo preferentemente con células tumorales marcadas con ^{51}Cr o Eu y la medición de ^{51}Cr o Eu específicamente liberado. Entre los controles se incluyen la incubación de las células diana tumorales con células efectoras, aunque sin el anticuerpo.

La expresión "citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)" se refiere a la lisis de células diana tumorales humanas por el anticuerpo según la invención en presencia del complemento. La CDC se mide preferentemente mediante el tratamiento de una preparación de células que expresan IGF-1R con un anticuerpo según la invención en presencia del complemento. Se presenta la CDC en el caso de que el anticuerpo induzca a una concentración de 100 nM la lisis (la muerte celular) de 20% o más de las células tumorales tras 4 horas. El ensayo se lleva a cabo preferentemente con células tumorales marcadas con ^{51}Cr o Eu y midiendo el ^{51}Cr o Eu liberado. Entre los controles se incluyen la incubación de las células diana tumorales con el complemento, aunque sin el anticuerpo.

La expresión "inhibición completa de la transducción de señales mediada por IGF-1" se refiere a la inhibición de la fosforilación mediada por IGF-1 de IGF-1R. Para este ensayo, se estimulan células que expresan IGF-1R, preferentemente células H322M, con IGF-1 y se tratan con un anticuerpo según la invención (resulta útil una concentración de anticuerpo de 5 nM o superior). A continuación, se lleva a cabo una SDS-PAGE y se mide la fosforilación de IGF-1R mediante análisis de transferencia western con un anticuerpo específico para las tirosinas fosforiladas. Se observa inhibición completa de la transducción de señales en el caso de que en la transferencia western no se detecte visiblemente ninguna banda referida a IGF-1R fosforilado. Los anticuerpos según la invención muestran una unión al mismo epítipo de IGF-1R que el anticuerpo 18 ó resultan inhibidos en su unión a IGF-1R debido al impedimento estérico a la unión debido al anticuerpo 18. Puede detectarse la inhibición de la unión mediante un ensayo SPR utilizando anticuerpo 18 inmovilizado e IGF-1R a una concentración de entre 20 y 50 nM y el anticuerpo que debe detectarse a una concentración de 100 nM. Una reducción de la señal de 50% o superior demuestra que el anticuerpo compite con el anticuerpo 18. Dicho ensayo puede llevarse a cabo del mismo modo mediante la utilización del anticuerpo 22 a modo de anticuerpo inmovilizado.

El término "epítipo" se refiere a un determinante de la proteína capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítipos habitualmente consisten de agrupamientos superficiales de moléculas químicamente activos, tales como cadenas laterales de aminoácidos o azúcares y habitualmente presentan características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión a los primeros pero no a los segundos se pierde en presencia de solventes desnaturizantes.

Los anticuerpos según la invención incluyen, además, aquellos anticuerpos que presentan "modificaciones conservadoras de la secuencia", es decir, modificaciones de la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos que no afectan o alteran las características anteriormente indicadas del anticuerpo según la invención. Pueden introducirse modificaciones mediante técnicas estándares conocidas de la técnica, tales como la mutagénesis dirigida a sitio y la mutagénesis mediada por PCR. Entre las sustituciones conservadoras de aminoácidos se incluyen aquéllas en las que se sustituye un residuo aminoácido por un residuo aminoácido que presenta una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de residuos aminoácidos que presentan cadenas laterales similares. Entre estas familias se incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). De esta manera, un residuo aminoácido no esencial predicho en un anticuerpo anti-IGF-1R humano puede sustituirse preferentemente por otro residuo aminoácido de la misma familia de cadena lateral.

Pueden llevarse a cabo sustituciones de aminoácidos mediante mutagénesis basándose en el modelaje molecular, tal como describen Riechmann L. *et al.*, Nature 332:323-327, 1988, y Queen C. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033, 1989.

En una realización preferente de la invención, los anticuerpos según la invención se caracterizan además por una o más de las características seleccionadas de entre el grupo seleccionadas de entre los parámetros de unión k_a , k_d y K_D , uniéndose al mismo epítipo al que se unen los anticuerpos 18 y 22, los valores de IC_{50} para la inhibición de la unión de IGF-1 e IGF-2 a IGF-1R sobre las células tumorales, y los valores de IC_{50} para la inhibición de la fosforilación de IGF-1R tras la estimulación de IGF-1 en las células tumorales. La inhibición de la fosforilación de IGF-1R conduce a la inhibición de la fosforilación de elementos posteriores, tales como PKB, a la regulación negativa de IGF-1R en las células tumorales, y a una influencia sobre el crecimiento tridimensional de las células tumorales *in vitro*. Los anticuerpos preferentemente se caracterizan adicionalmente a partir de sus valores farmacocinéticos y farmacodinámicos, y de la reactividad cruzada con otras especies.

Los anticuerpos según la invención inhiben la fosforilación de tirosinas de IGF-1R y preferentemente también la fosforilación de tirosinas de PKB en un grado similar.

Los anticuerpos según la invención preferentemente regulan negativamente el nivel de proteínas IGF-1R en las células

tumorales y en tumores, por ejemplo en xenoinjertos tumorales.

Los anticuerpos según la invención inhiben preferentemente el crecimiento tridimensional de las células tumorales en un ensayo de formación de colonias, así como la proliferación de las células que expresan IGF-1R (por ejemplo las células NIH 3T3).

Los anticuerpos según la invención preferentemente no inhiben la unión de la insulina al receptor de insulina en un ensayo de unión competitiva con células 3T3 que sobreexpresan receptor de insulina, utilizando el anticuerpo en una concentración de 200 nmoles/l.

Los anticuerpos según la invención preferentemente se producen por medios recombinantes. Dichos métodos son ampliamente conocidos del estado de la técnica y comprenden la expresión de proteínas en células procarióticas y eucarióticas con el posterior aislamiento del polipéptido anticuerpo y habitualmente la purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de proteínas, se insertan ácidos nucleicos codificantes de cadenas ligeras y pesadas o fragmentos de las mismas en vectores de expresión mediante métodos estándares. La expresión se lleva a cabo en una célula huésped procariótica apropiada o en una célula huésped CHO, célula huésped NS0, célula huésped SP2/0, célula huésped HEK293, célula huésped COS, célula de levadura o célula huésped *E. coli*, y el anticuerpo se recupera a partir de las células (sobrenadante o células después de la lisis).

La producción recombinante de anticuerpos es bien conocida del estado de la técnica y se describe, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides S.C., *Protein Expr. Purif.* 17:183-202, 1999; Geisse S. *et al.*, *Protein Expr. Purif.* 8:271-282, 1996; Kaufman R.J., *Mol. Biotechnol.* 16:151-161, 2000; Werner R.G., *Drug Res.* 48:870-880, 1998.

Los anticuerpos pueden encontrarse presentes en células completas, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o en forma sustancialmente pura. Se llevó a cabo purificación con el fin de eliminar otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándares, incluyendo el tratamiento alcalino/SDS, formación de bandas en CsCl, cromatografía de columna, electroforesis en gel de agarosa, y otras bien conocidas de la técnica (ver Ausubel F. *et al.*, editor, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987).

La expresión en células NS0 se describe en, por ejemplo, Barnes L.M. *et al.*, *Cytotechnology* 32:109-123, 2000; Barnes, L.M. *et al.*, *Biotech. Bioeng.* 73:261-270, 2001. La expresión transitoria se describe en, por ejemplo, Durocher Y. *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 30:E9, 2002. La clonación de dominios variables se describe en Orlandi, R. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3833-3837, 1989; Carter, P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285-4289, 1992, y en Norderhaug, L. *et al.*, *J. Immunol. Methods* 204:77-87, 1997. Un sistema de expresión transitoria preferente (HEK293) se describe en Schlaeger, E.-J. y Christensen, K., *Cytotechnology* 30:71-83, 1999, y en Schlaeger, E.-J., *J. Immunol. Methods* 194:191-199, 1996.

Entre las secuencias de control que resultan adecuadas para los procariotas se incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia de operador, y un sitio de unión ribosómica. Es conocido que las células eucarióticas utilizan promotores, intensificadores y señales de poliadenilación.

Un ácido nucleico se encuentra "operablemente ligado" en el caso de que se sitúe en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o líder secretorio se encuentra operablemente ligado a ADN para un polipéptido en el caso de que se exprese como preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o intensificador se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que afecte a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión ribosómica se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que se sitúe de manera que facilite la traducción. Generalmente, la expresión "operablemente ligado" se refiere a que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, en el caso de un líder secretorio, a que son contiguas y se encuentran en el mismo marco de lectura. Sin embargo, los intensificadores no son necesariamente contiguos. La unión se lleva a cabo mediante ligación en sitios de restricción apropiados. En el caso de que dichos sitios no existan, se utilizan adaptadores oligonucleótidos sintéticos o linker según la práctica convencional.

Se separan convenientemente los anticuerpos monoclonales a partir del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A-sefariosa, cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. El ADN y ARN codificante de los anticuerpos monoclonales se aísla y se secuencia fácilmente mediante procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir como fuente de dicho ADN y ARN. Tras el aislamiento, el ADN puede insertarse en vectores de expresión, que seguidamente se transfectan en células huésped, tales como células HEK 293, células CHO o células de mieloma que de otra manera no producirían proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células huésped.

Se preparan variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo de IGF-1R humano mediante la introducción de cambios apropiados de nucleótidos en el ADN codificante del anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Sin embargo, estas modificaciones únicamente pueden llevarse a cabo bajo condiciones muy limitadas, por ejemplo tal como se ha indicado anteriormente. Por ejemplo, las modificaciones no alteran las características anteriormente indicadas del anticuerpo, tales como el isotipo de IgG y la unión de epítomos, pero pueden mejorar el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad de las proteínas o facilitar la purificación.

También puede sustituirse cualquier residuo cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación correcta del anticuerpo anti-IGF-1R, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar entrecruzamientos aberrantes. A la inversa, pueden añadirse uno o más enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente en el caso de que el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv).

Otro tipo de variante de aminoácidos del anticuerpo altera el patrón original de glucosilación del anticuerpo. El término "alteración" se refiere a eliminar uno o más grupos carbohidrato presentes en el anticuerpo y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no se encuentran presentes en el anticuerpo. La glucosilación de los anticuerpos típicamente es ligada a N. La expresión "ligada a N" se refiere a la unión del grupo carbohidrato a la cadena lateral de un residuo asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del grupo carbohidrato a la cadena lateral de la asparagina. De esta manera, la presencia de cualquier de dichas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio potencial de glucosilación. La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo se consigue convenientemente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más de las secuencias de tripéptido anteriormente indicadas (para los sitios de glucosilación ligados a N).

Las moléculas de ácidos nucleicos codificantes de las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-IGF-1R se preparan mediante una diversidad de métodos conocidos de la técnica. Entre estos métodos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos naturales) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótios (o sitio-dirigida), la mutagénesis por PCR y la mutagénesis por inserción de casete de una variante preparada anteriormente o de una versión no variante de anticuerpo anti-IGF-1R humanizado.

La invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden el anticuerpo según la invención conjugado con un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la mixma), un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado) o un profármaco de un agente citotóxico. Los agentes que resultan útiles en la generación de dichos inmunoconjugados han sido indicados anteriormente. Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden utilizarse se incluyen la cadena A de la toxina diftérica, fragmentos activos no ligantes de la toxina diftérica, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de la ricina, la cadena A de la abrina, la cadena A de la modeccina, la alfa-sarcina, las proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas de diantina, las proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), el inhibidor de *Momordica charantia*, la curcina, la crotina, el inhibidor de *Saponaria officinalis*, la gelonina, la mitogelina, la restrictocina, la fenomicina, la enomicina y los tricotecenos.

Los conjugados de anticuerpo y agente citotóxico se preparan utilizando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncional tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazo-niumbenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolieno) y compuestos de bis-flúor activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina tal como se describe en Vitetta E.S. *et al.*, Science 238:1098-1104, 1987. El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilén-triaminapentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo (ver la patente WO n° 94/11026).

Otro tipo de modificación covalente implica el acoplamiento químico o enzimático de glucósidos con el anticuerpo. Estos procedimientos resultan ventajosos en el aspecto de que no requieren la producción del anticuerpo en una célula huésped que presenta capacidades de glucosilación para la glucosilación N-ligada u O-ligada. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el azúcar o azúcares pueden unirse a: (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de la cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de la serina, la treonina o la hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos tales como los de la fenilalanina, la tirosina o el triptófano, o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos se describen en la patente WO n° 87/05330, y en Aplin J.D. y Wriston J.C. Jr., CRC Crit. Rev. Biochem., 259-306, 1981.

La eliminación de cualquier grupo carbohidrato presente en el anticuerpo puede llevarse a cabo química o enzimáticamente. La desglucosilación química requiere la exposición del anticuerpo al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o a un compuesto equivalente. Este tratamiento resulta en el corte de la mayoría o la totalidad de los azúcares excepto el azúcar de enlace (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando el anticuerpo intacto. La desglucosilación química se describe en Sojhr H.T. y Bahl O.P., Arch. Biochem. Biophys. 259:52-57, 1987, y en Edge A.S. *et al.*, Anal. Biochem. 118:131-137, 1981. El corte enzimático de los grupos carbohidrato en los anticuerpos puede llevarse a cabo mediante la utilización de una diversidad de endoglucosidasas y exoglucosidasas, tal como se describe en Thotakura N.R. y Bahl O.P., Meth. Enzymol. 138:350-359, 1987.

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende unir el anticuerpo a uno de entre una diversidad de polímeros no proteicos, por ejemplo polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera indicada en las patentes US nº 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona célula B aisladas a partir de un animal no humano transgénico, por ejemplo un ratón transgénico, que expresa los anticuerpos anti-IGF-1R humanos según la invención. Preferentemente, las células B aisladas se obtienen a partir de un animal no humano transgénico, por ejemplo de un ratón transgénico, que ha sido inmunizado con una preparación purificada o enriquecida de antígeno IGF-1R y/o de células que expresan IGF-1R. Preferentemente, el animal no humano transgénico, por ejemplo un ratón transgénico, presenta un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana codificante de la totalidad o de una parte de un anticuerpo de la invención. Las células B aisladas seguidamente se immortalizan, proporcionando una fuente (por ejemplo un hibridoma) de anticuerpos anti-IGF-1R humanos. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente invención también proporciona un hibridoma capaz de producir anticuerpos monoclonales humanos según la invención. En una realización, el hibridoma incluye una célula B obtenida a partir de un animal no humano transgénico, por ejemplo un ratón transgénico que presenta un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana codificantes de la totalidad o de una parte de un anticuerpo de la invención, fusionado con una célula immortalizada.

En una realización particular, el animal no humano transgénico es un ratón transgénico que presenta un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana codificante de la totalidad o de una parte de un anticuerpo de la invención. El animal no humano transgénico puede inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida de antígeno IGF-1R y/o células que expresan IGF-1R. Preferentemente, el animal no humano transgénico, por ejemplo el ratón transgénico, es capaz de producir isotipos de IgG1 de anticuerpos monoclonales humanos contra IGF-1R.

Los anticuerpos monoclonales humanos según la invención pueden producirse mediante la inmunización de un animal no humano transgénico, por ejemplo un ratón transgénico, que presenta un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana codificante de la totalidad o de una parte de un anticuerpo de la invención, con una preparación purificada o enriquecida del antígeno IGF-1R y/o células que expresan IGF-1R. A continuación, se obtienen células B (por ejemplo células B esplénicas) del animal y se fusionan con células de mieloma, formando células de hibridoma inmortales que secretan los anticuerpos monoclonales humanos contra IGF-1R.

En una realización preferente, pueden generarse anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra IGF-1R utilizando ratones transgénicos que portan partes del sistema inmunológico humano y no del sistema del ratón. Estos ratones transgénicos, denominados en la presente memoria ratones "huMAB", contienen un minilocus génico de inmunoglobulina humana que codifica genes de inmunoglobulina humana no reorganizados que incluyen la cadena pesada (μ y γ) y la cadena ligera κ (genes de región constante), conjuntamente con mutaciones dirigidas que inactivan los loci endógenos de las cadenas μ y κ (Lonberg N. *et al.*, Nature 368:856-859, 1994). Por consiguiente, los ratones muestran una expresión reducida de IgM o K de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadenas pesada y ligera humanas introducidos experimentan intercambio de clase y mutación somática, generando anticuerpos monoclonales IgG humanos de elevada afinidad (Lonberg N. *et al.*, Nature 368:856-859, 1994, revisado en Lonberg N., Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101, 1994; Lonberg N. y Huszar D., Intern. Rev. Immunol. 25:69-93, 1995, y Harding F. y Lonberg N., Ann. N. Acad. Sci. 764:536-546, 1995). La preparación de ratones huMAB se describe en Taylor L. *et al.*, Nucleic Acids Research 20:6287-6295, 1992; Chen J. *et al.*, International Immunology 5:647-656, 1993; Tuailon N. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724, 1993; Choi T.K. *et al.*, Nature Genetics 4:117-123, 1993; Chen J. *et al.*, EMBO J. 12:821-830, 1993; Tuailon N. *et al.*, Immunol. 152:2912-2920, 1994; Lonberg N. *et al.*, Nature 368:856-859, 1994; Lonberg N., Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101, 1994; Taylor L. *et al.*, Int. Immunol. 6:579-591, 1994; Lonberg N. y Huszar D., Intern. Rev. Immunol. 25:65-93, 1995; Harding F. y Lonberg N., Ann. N. Acad. Sci. 764:536-546, 1995; Fishwild D.M. *et al.*, Nat. Biotechnol. 14:845-851, 1996, el contenido de los cuales se incorpora como referencia en la presente memoria en su totalidad. Ver, además, las patentes US nº 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; 5.545.807; 5.770.429; y las patentes WO nº 98/24884, nº 94/25585, nº 93/1227, nº 92/22645 y nº 92/03918.

Para generar anticuerpos monoclonales totalmente humanos contra IGF-1R, los ratones HuMAb pueden inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida de antígeno IGF-1R y/o con células que expresan IGF-1R según el método general, tal como describen Lonberg N. *et al.*, Nature 368:856-859, 1994; Fishwild D.M. *et al.*, Nat. Biotechnol. 14:845-851, 1996, y la patente WO n° 98/24884. Preferentemente, los ratones eran de 6 a 16 semanas de edad en la primera inmunización. Por ejemplo, puede utilizarse una preparación purificada o enriquecida de antígeno IGF-1R soluble (por ejemplo purificado a partir de células que expresan IGF-1R) para inmunizar los ratones HuMAb intraperitonealmente. En el caso de que las inmunizaciones con una preparación purificada o enriquecida de antígeno IGF-1R no resulten en anticuerpos, los ratones también pueden inmunizarse con células que expresan IGF-1R, por ejemplo una línea de células tumorales, para estimular respuestas inmunológicas. La experiencia acumulada con diversos antígenos ha demostrado que los ratones transgénicos HuMAb responden mejor al inmunizarlos inicialmente por vía intraperitoneal (i.p.) con antígeno en adyuvante completo de Freund, seguido de inmunizaciones i.p. cada dos semanas (por ejemplo hasta un total de 6) con antígeno en adyuvante incompleto de Freund. Puede realizarse un seguimiento de la respuesta inmunológica durante el curso del protocolo de inmunización, obteniendo muestras de plasma mediante sangrados retroorbitales. El plasma puede cribarse mediante ELISA y los ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-IGF-1R pueden utilizarse plasma para la inmortalización de las células B correspondientes. Los ratones pueden recibir un refuerzo intravenoso con antígeno 3 a 4 días antes del sacrificio y extracción de bazo y nódulos linfáticos. Se encontró que podía resultar necesario llevar a cabo 2 a 3 fusiones para cada antígeno. Se inmunizaron varios ratones para cada antígeno. Por ejemplo, puede inmunizarse un total de doce ratones HuMAb de las cepas HCo7 y HCo12.

Los ratones HCo7 pueden presentar una alteración JKD en sus genes endógenos de cadena ligera (kappa) (tal como se describe en Chen J. *et al.*, EMBO J. 12:821-830, 1993), una alteración CMD en sus genes endógenos de cadena pesada (tal como se describe en el Ejemplo 1 de la patente WO n° 01/14424), un transgén de cadena ligera kappa humana KCo5 (tal como se describe en Fishwild D.M. *et al.*, Nat. Biotechnol. 14:845-851, 1996) y un transgén de cadena pesada humana HCo7 (tal como se describe en la patente US n° 5.770.429).

Los ratones HCo12 presentan una alteración JKD en sus genes endógenos de cadena ligera (kappa) (tal como se describe en Chen J. *et al.*, EMBO J. 12:821-830, 1993), una alteración CMD en sus genes endógenos de cadena pesada (tal como se describe en el Ejemplo 1 de 101; Lonberg N. y Huszar D., Intern. Rev. Immunol. 25:65-93, 1995; y Harding F. y Lonberg N., Ann. N. Acad. Sci. 764:536-546, 1995). La preparación de ratones HuMAb se describe en Taylor L. *et al.*, Nucleic Acids Research 20:6287-6295, 1992; Chen J. *et al.*, International Immunology 5:647-656, 1993; Tuailon N. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724, 1993; Choi T.K. *et al.*, Nature Genetics 4:117-123, 1993; Chen J. *et al.*, EMBO J. 12:821-830, 1993; Tuailon N. *et al.*, Immunol. 152:2912-2920, 1994; Lonberg N. *et al.*, Nature 368:856-859, 1994; Lonberg N., Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101, 1994; Taylor L. *et al.*, Int. Immunol. 6:579-591, 1994; Lonberg N. y Huszar D., Intern. Rev. Immunol. 25:65-93, 1995; Harding F. y Lonberg N., Ann. N. Acad. Sci. 764:536-546, 1995; Fishwild D.M. *et al.*, Nat. Biotechnol. 14:845-851, 1996. Ver, además, las patentes US n° 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; 5.545.807; 5.770.429; y las patentes WO n° 98/24884, n° 94/25585, n° 93/1227, n° 92/22645 y n° 92/03918.

Para generar anticuerpos monoclonales totalmente humanos contra IGF-1R, los ratones HuMAb pueden inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida de antígeno IGF-1R y/o con células que expresan IGF-1R según el método general, tal como describen Lonberg N. *et al.*, Nature 368:856-859, 1994; Fishwild D.M. *et al.*, Nat. Biotechnol. 14:845-851, 1996, y la patente WO n° 98/24884. Preferentemente, los ratones eran de 6 a 16 semanas de edad en la primera inmunización. Por ejemplo, puede utilizarse una preparación purificada o enriquecida de antígeno IGF-1R soluble (por ejemplo purificado a partir de células que expresan IGF-1R) para inmunizar los ratones HuMAb intraperitonealmente. En el caso de que las inmunizaciones con una preparación purificada o enriquecida de antígeno IGF-1R no resulten en anticuerpos, los ratones también pueden inmunizarse con células que expresan IGF-1R, por ejemplo una línea de células tumorales, para estimular respuestas inmunológicas. La experiencia acumulada con diversos antígenos ha demostrado que los ratones transgénicos HuMAb responden mejor al inmunizarlos inicialmente por vía intraperitoneal (i.p.) con antígeno en adyuvante completo de Freund, seguido de inmunizaciones i.p. cada dos semanas (por ejemplo hasta un total de 6) con antígeno en adyuvante incompleto de Freund. Puede realizarse un seguimiento de la respuesta inmunológica durante el curso del protocolo de inmunización, obteniendo muestras de plasma mediante sangrados retroorbitales. El plasma puede cribarse mediante ELISA y los ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-IGF-1R pueden utilizarse plasma para la inmortalización de las células B correspondientes. Los ratones pueden recibir un refuerzo intravenoso de: a) una cadena pesada de anticuerpo que comprende como CDRs, la CDR1 (aminoácidos 31 a 35), la CDR2 (aminoácidos 50 a 66), y la CDR3 (aminoácidos 99 a 107) de la secuencia SEC ID n° 1 ó 3, b) una cadena ligera de anticuerpo que comprende como CDRs, la CDR1 (aminoácidos 24 a 34), la CDR2 (aminoácidos 50 a 56) y la CDR3 (aminoácidos 89 a 98) de secuencia SEC ID n° 2 ó 4.

Los dominios variables reconstruidas de las cadenas pesada y ligera según la invención se combinan con secuencias de promotor, de inicio de traducción, de región constante, región 3' no traducida, de poliadenilación y de terminación de transcripción para formar constructos de vector de expresión. Los constructos de expresión de cadena pesada y de

cadena ligera pueden agruparse en un único vector, cotransfectarse, transfectarse en serie o transfectarse separadamente en células huésped que seguidamente se fusionan para formar una única célula huésped que exprese ambas cadenas.

- 5 Por consiguiente, la invención proporciona un método para la producción de un anticuerpo humano recombinante según la invención, caracterizado por la expresión de un ácido nucleico codificante de: a) una cadena pesada de anticuerpo que comprende como CDRs, la CDR1 (aminoácidos 31 a 35), la CDR2 (aminoácidos 50 a 66), y la CDR3 (aminoácidos 99 a 107) de la secuencia SEC ID nº 1 ó 3, b) una cadena ligera de anticuerpo que comprende como CDRs, la CDR1 (aminoácidos 24 a 34), la CDR2 (aminoácidos 50 a 56) y la CDR3 (aminoácidos 89 a 98) de secuencia SEC ID nº 2 ó 4.

10 La invención comprende además la utilización de un anticuerpo según la invención para el diagnóstico de IGF-1R *in vitro*, preferentemente mediante un ensayo inmunológico que determina la unión entre IGF-1R de una muestra y el anticuerpo según la invención.

- 15 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo una composición farmacéutica, que contiene un anticuerpo monoclonal humano o una combinación de anticuerpos monoclonales humanos, o la porción ligante de antígeno del mismo, de la presente invención, formulados conjuntamente con un portador farmacéuticamente aceptable.

20 Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir una composición de la presente invención con por lo menos un agente antitumoral u otra terapia convencional.

25 Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico que resulta útil en el tratamiento del cáncer. Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen adriamicina, doxorubicina, 5-fluorouracilo, citosina arabinósido ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, taxotere (docetaxel), busulfán, gemcitabina, citoxina, taxol, metotrexato, cisplatino, melfalán, vinblastina, bleomicina, etopósido, ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, carboplatino, tenipósido, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicina, esperamicina (ver la patente US nº 4.675.187), melfalán y otras mostazas nitrogenadas relacionadas.

30 La expresión "agente citotóxico" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o que provoca la destrucción de las mismas. La expresión pretende incluir isótopos radioactivos, agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.

35 El término "profármaco" tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que resulta menos citotóxico para las células tumorales en comparación con el fármaco parental y que es capaz de resultar enzimáticamente activado o convertido en la forma parental más activa. Ver, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", Biochemical Society Transactions 14: 375-382, 615th Meeting Belfast, 1986, y Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt *et al.*, (ed.), páginas 247-267, Humana Press, 1985. Entre los profármacos de la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados con D-aminoácidos, profármacos glucosilados, profármacos de anillo β -lactamo, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituidos o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituidas, 5-fluorocitosina y otros profármacos 5-fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco libre citotóxico activo. Entre los ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivatizarse en una forma profármaco para la utilización en la presente invención se incluyen, aunque sin limitación, aquellos agentes quimioterapéuticos indicados anteriormente.

50 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y la totalidad de solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el portador resulta adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo mediante inyección o infusión).

55 Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del anticuerpo y que no proporciona ningún efecto toxicológico no deseado (ver, por ejemplo, Berge S.M. *et al.*, J. Pharm. Sci. 66:1-19, 1977). Dichas sales se encuentran incluidas en la invención. Entre los ejemplos de dichas sales se incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Entre las sales de adición de ácido se incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como sales hidroclicóricas.

60

Una composición de la presente invención puede administrarse mediante una diversidad de métodos conocidos de la técnica. Tal como apreciará el experto en la materia, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados.

5 Para administrar un compuesto de la invención mediante determinadas vías de administración, puede resultar necesario recubrir el compuesto con un material, o coadministrar el compuesto con un material, para impedir su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse en un sujeto en un portador apropiado, por ejemplo liposomas o un diluyente. Entre los diluyentes farmacéuticamente aceptables se incluyen solución salina y soluciones tamponadoras acuosas.

10 Entre los portadores farmacéuticamente aceptables se incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La utilización de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocida de la técnica.

15 Las expresiones "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a modos de administración diferentes de la administración entérica y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluyen, sin limitarse a las mismas, las inyecciones e infusiones intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal

20 Dichas composiciones también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse tanto mediante procedimientos de esterilización, *supra*, como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabén, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede resultar deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, puede conseguirse la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina, convertida en la forma parental más activa. Ver, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", Biochemical Society Transactions 14: 375-382, 615th Meeting Belfast, 1986, y Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt *et al.*, (ed.), páginas 247-267, Humana Press, 1985. Entre los profármacos de la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados con D-aminoácidos, profármacos glucosilados, profármacos de anillo β -lactamo, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituidos o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituidos, 5-fluorocitosina y otros profármacos 5-fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco citotóxico libre más activo. Entre los ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivatizarse en una forma profármaco para la utilización en la presente invención se incluyen, aunque sin limitación, aquellos agentes quimioterapéuticos indicados anteriormente.

40 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y la totalidad de solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el portador resulta adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo mediante inyección o infusión).

45 Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del anticuerpo y que no proporciona ningún efecto toxicológico no deseado (ver, por ejemplo, Berge S.M. *et al.*, J. Pharm. Sci. 66:1-19, 1977). Dichas sales se encuentran incluidas en la invención. Entre los ejemplos de dichas sales se incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Entre las sales de adición de ácido se incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como sales hidroclicóricas.

50 Una composición de la presente invención puede administrarse mediante una diversidad de métodos conocidos de la técnica. Tal como apreciará el experto en la materia, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados.

55 Para administrar un compuesto de la invención mediante determinadas vías de administración, puede resultar necesario recubrir el compuesto con un material, o coadministrar el compuesto con un material, para impedir su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse en un sujeto en un portador apropiado, por ejemplo liposomas o un diluyente. Entre los diluyentes farmacéuticamente aceptables se incluyen solución salina y soluciones tamponadoras acuosas.

60

Entre los portadores farmacéuticamente aceptables se incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La utilización de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocida de la técnica.

5 Las expresiones “administración parenteral” y “administrado parenteralmente” tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a modos de administración diferentes de la administración entérica y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluyen, sin limitarse a las mismas, las inyecciones e infusiones intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal

10 Dichas composiciones también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse tanto mediante procedimientos de esterilización, indicados anteriormente, como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabén, clorobutanol, fenol o ácido sórbico. También puede resultar deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares o cloruro sódico, en las composiciones. Además, puede conseguirse la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

15 Con independencia de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que pueden utilizarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por el experto en la materia.

20 Los niveles reales de las dosis de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden modificarse de manera que se obtenga una cantidad del ingrediente activo que resulte efectiva para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin que resulte tóxico para el paciente. El nivel de dosis seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos, incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención utilizadas, la vía de administración, el momento de la administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se utiliza, la duración del tratamiento, otros fármacos, los compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares utilizadas, la edad, sexo, peso, condición, estado de salud general e historia médica del paciente bajo tratamiento, y factores similares bien conocidos de la técnica médica.

25 La composición debe ser estéril y fluida en grado suficiente para que la composición resulte administrable mediante jeringa. Además de agua, el portador preferentemente es una solución salina tamponada isotónica.

30 Puede mantenerse la fluidez correcta, por ejemplo mediante la utilización de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento de un tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión, y mediante la utilización de surfactantes. En muchos casos, resulta preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes, tales como manitol o sorbitol, y cloruro sódico en la composición.

Descripción del listado de secuencias

[0118]

45 SEC ID nº 1 a 4 Secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de dominios de región variable de cadenas ligera y pesada de los anticuerpos 18 y 22
SEC ID nº 5 y nº 6 Secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del dominio de región constante humana.

50 Descripción de las figuras

[0119]

55 Figura 1 Expresión en superficie de IGF-1R en cultivo celular de baja y alta densidad.

Análisis FACS

60 Además de la determinación mediante ELISA específica de antígeno, también se determinaron mediante análisis FACS los títulos anti-IGF-1R en sueros de ratones inmunizados. Las células NIH 3T3 IGF-1R y las células NIH 3T3 IGF-1R no transfectadas se incubaron con sueros diluidos durante 30 minutos a 4°C. Se utilizó el suero preinmunización a modo de

control negativo. Inicialmente, se utilizaron 200 ng/ml de anti-IGF-1R humano de cabra a modo de control positivo. Las células se lavaron tres veces en PBS suplementado con 1% de albúmina de suero bovino y azida al 0,01%. A continuación, las células se incubaron con fragmentos ligantes de antígeno conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (fragmentos F(ab')₂) de IgG de rata anti-humana diluida 1/100 en tampón para FACS, durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron dos veces en tampón para FACS y las muestras se analizaron en un FACSCalibur (Becton Dickinson, Erembodegem-Aalst, Bélgica).

Administración de refuerzo en los ratones

Al alcanzar títulos séricos suficientes de anti-IGF-1R, los ratones recibieron dos refuerzos adicionales de 15 µg de dominio extracelular de IGF-1R en 200 µl de PBS por vía intravenosa (i.v.) 4 y 3 días antes de la fusión.

Generación de hibridoma

Se sacrificaron los ratones y se recogió el bazo y los nódulos linfáticos que flanqueaban la aorta abdominal y la vena cava. La fusión de esplenocitos y células de nódulo linfático con la pareja de fusión de células SP 2.0 se llevó a cabo según procedimientos operativos estándares.

κ-ELISA

Para determinar si los hibridomas que resultaban de la fusión generaban anticuerpos humanos, se llevó a cabo una κ-ELISA. Las placas de ELISA se recubrieron con anticuerpo de cadena ligera κ de rata anti-IgG humana (DAKO) diluido 1/10.000 en PBS mediante incubación durante la noche a 4°C. Tras descartar los pocillos, las placas se bloquearon mediante la incubación con PBSTC durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, los pocillos se incubaron con sobrenadante de cultivo de hibridoma, diluido 1/2 en PBSTC. Se utilizó el medio de cultivo diluido 1/2 en PBSTC a modo de control negativo y el suero de ratón positivo para cadena ligera κ diluido 1/100 en PBSTC, a modo de control positivo. A continuación, los pocillos se lavaron dos veces y se incubaron con F(ab')₂ de rata anti-IgG humana (DAKO) conjugado con HRP, diluido 1/2.000 en PBSTC durante 1 hora a 37°C. Los pocillos se lavaron tres veces y se revelaron los ensayos con solución ABTS® recién preparada (1 mg/ml) durante 30 minutos a temperatura ambiente (RT) en la oscuridad. Se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de placas de ELISA. Se prepararon los anticuerpos monoclonales 18 y 22.

Ejemplo 2

Determinación de la afinidad de los anticuerpos anti-IGF-1R para IGF-1R

[0125]

Instrumento:	BIACORE® 3000
Chip:	CM5
Acoplamiento:	Acoplamiento de aminas
Tampón:	HBS (HEPES, NaCl), pH 7,4, 25°C

Para las mediciones de afinidad, se acoplaron anticuerpos anti-FCγ humano (de conejo) con la superficie del chip para la presentación del anticuerpo contra IGF-1R. Se añadió dominio extracelular de IGF-1R a diversas concentraciones en solución. Se midió la asociación mediante una inyección de IGF-1R de 3 minutos; se midió la disociación mediante lavado de la superficie del chip con tampón durante 5 minutos. Los datos de afinidad para los anticuerpos 18 y 22 se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1:

Datos de afinidad medidos mediante SPR (BIACORE® 3000)			
Anticuerpo	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K _D (M)
18	1,49 x 10 ⁵	1,03 x 10 ⁻⁷	6,95 x 10 ⁻¹³
22	1,47 x 10 ⁵	9,64 x 10 ⁻⁵	6,56 x 10 ⁻¹⁰

Ejemplo 3**Crecimiento tridimensional de células tumorales y sobreexpresión del receptor de IGF-1 en el contacto célula con célula (cultivo 3D)**

5

Materiales y métodos:

Se cultivaron las células NCI H322M en medio RPMI sobre cubreobjetos de vidrio de grado óptico a densidad baja o superconfluentes con el fin de estudiar los efectos sobre la expresión en superficie de IGF-1R. En paralelo, se congeló instantáneamente en isopentano tejido de xenoinjerto H322M aislado a partir del grupo de control (ratones no tratados) y se realizaron criosecciones de 5 µm de grosor. Se llevó a cabo el marcaje de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo monoclonal anti-IGF-1R de ratón (αIR3, 5 µg/ml) o un anticuerpo según la invención, seguido de un anticuerpo de cabra anti-ratón o un anticuerpo de cabra anti-ratón marcado con Cy3 (Amersham Biosciences, GB) o Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes, Inc., USA). Se obtuvieron imágenes de los especímenes en un microscopio confocal Leica SP2 ó se analizaron mediante FACS.

Resultados:

Al obtenerse imágenes mediante microscopía confocal de células H322M cultivadas a alta densidad, se puso de manifiesto que IGF-1R se agrupaba específicamente en los sitios de contacto célula-célula. En la comparación con las células H322M cultivadas *in vivo*, es decir tejido de xenoinjerto, se observó una inesperada similitud a cultivos *in vitro* densamente empaquetados en el aspecto de la organización de los receptores de IGF-1 de superficie.

La regulación positiva de los receptores de IGF-1 de superficie en cultivos superconfluentes de células H322M también se cuantificó mediante FACS. La expresión de los receptores de IGF-1 de superficie se incrementó en más de 10 veces al cultivar las células bajo condiciones de alta densidad en comparación con el cultivo a baja densidad, sin contactos célula-célula significativos.

Otras células tumorales, tales como HT29, MDA231 y MCF-7 mostraron un comportamiento similar, indicando que la regulación positiva de los receptores de IGF-1 sobre la superficie celular tras el establecimiento de los sitios de contacto célula-célula no es una característica única de las células H322M sino que aparentemente es una propiedad general propia de una organización más similar a un tejido que también se observa *in vivo* (fig. 1).

Ejemplo 4

35

Inhibición del crecimiento de las células tumorales H322M que expresan IGF-1R en cultivo 3D bajo tratamiento con anticuerpo 18 (ensayo WST)

Se cultivaron células H322M en medio RPMI1640/FCS al 0,5% en placas recubiertas con poli-HEMA (poli(2-hidroxietilmetacrilato)) para evitar la adherencia a la superficie de plástico. Bajo estas condiciones, las células H322M forman esferoides densos que crecen tridimensionalmente (una propiedad denominada independencia de anclaje). Estos esferoides presentan una gran similitud con la arquitectura histológica y organización tridimensionales de los tumores sólidos *in situ*. Se incubaron los cultivos de esferoides durante 5 días en presencia de cantidades crecientes de anticuerpos, de 0 a 240 nM. Se utilizó el ensayo de conversión de WST para medir la inhibición del crecimiento. Al tratar los cultivos de esferoides de H322M con diferentes concentraciones del anticuerpo 18 (1 a 240 nM), pudo observarse una inhibición del crecimiento dependiente de la dosis (fig. 2).

Ejemplo 5**Inhibición del crecimiento de células tumorales H322M que expresan IGF-1R en cultivo 3D (ensayo de formación de colonias)**

Se cultivaron células H322M en medio RPMI1640/FCS al 10% en placas recubiertas con poli-HEMA para evitar la adherencia a la superficie de plástico. Bajo estas condiciones, las células H322M forman esferoides densos que crecen tridimensionalmente (una propiedad denominada independencia de anclaje). Estos esferoides presentan una gran similitud con la arquitectura histológica y organización tridimensionales de los tumores sólidos *in situ*. Se incubaron los cultivos de esferoides durante 5 a 10 días en presencia de cantidades crecientes de anticuerpos, de 0 a 7,5 µg/ml. Se utilizó anticuerpo monoclonal de <HBV> a modo de control negativo. Se obtuvieron imágenes de las colonias en un microscopio invertido (Zeiss Axiovert) utilizando contraste de fases y se realizó un recuento utilizando un sistema automático de obtención de imágenes (MetaMorph). Al tratar los cultivos de esferoides de H322M con diferentes concentraciones (0,5 a 7,5 µg/ml) de anticuerpo 18, pudo observarse una inhibición del crecimiento dependiente de la

dosis, mientras que el anticuerpo de control del <HBV> presentó un efecto reducido o nulo. Tanto el número como el tamaño de las colonias se redujo claramente en los cultivos tratados con 7,5 µg/ml de anticuerpo 18 (fig. 3).

5 El análisis cuantitativo de las colonias de diámetro superior a 100 µm reveló que se había reducido el número de colonias en aproximadamente 66% en los cultivos tratados con 0,5 µg/ml de anticuerpo 18 (fig. 4).

Ejemplo 6

Inhibición de la unión de IGF-1 e IGF-2 a células tumorales que expresan IGF-1R

10 Con el fin de determinar la capacidad del anticuerpo de la invención de bloquear la unión de los ligandos IGF-1 e IGF-2 al receptor de IGF-1 (IGF-1R), se llevaron a cabo experimentos de competición con péptidos ligandos marcados radioactivamente. Se sembraron células tumorales humanas (HT29, NCI H322M, 0,5 a 1×10^5 /ml) en una placa con medio RPMI1640 (PAA, n° de cat. E15-039) suplementado con L-glutamina 2 mM, 1x aminoácidos no esenciales (Gibco, n° de cat. 11140-035), piruvato sódico 1 mM (Gibco, n° de cat. 11360-039) y FCS inactivado por calor al 10% (PAA, n° de cat. A15-771). Se inocularon seis botellas en el formato T175 con 20 ml de células en el medio respectivo en cada experimento y se cultivaron durante dos días a 37°C y con 5% de CO₂ para obtener monocapas celulares confluentes.

20 Para recoger células individuales, se añadieron 2 ml de 1x tripsina/EDTA (Gibco, n° de cat. 25300-054) en cada matraz T175 y se realizó un seguimiento del desenganchamiento de las células utilizando un microscopio Zeiss Axiovert25. Se recogieron las células y se añadió el medio con FCS al 10% indicado anteriormente hasta un volumen total de 50 ml. Se aislaron nuevamente las células mediante centrifugación durante 10 minutos a 1.000 rpm (Heraeus sepatech, Omnifuge 2.0 RS) y se resuspendieron en 50 ml de tampón de unión (NaCl 120 mM, KCl 5 mM, MgSO₄ 1,2 mM, EDTA 1 mM, D(+)-glucosa 10 mM, NaAc 15 mM, Hepes 100 mM, pH 7,6, BSA al 1%). Se realizó un recuento de las células, se aislaron nuevamente mediante centrifugación y se ajustó con tampón de unión hasta 1×10^6 células/ml.

30 Los péptidos IGF-1 e IGF-2 marcados con ¹²⁵I (Amersham, ~2.000 Ci/mmol, n° de cat. IM172 e IM238), solubilizados en CH₃COOH al 0,1%, se diluyeron en tampón de unión hasta una actividad final de 4×10^5 pulsos/(minuto x ml). Se añadieron 75 µl de anticuerpo a las concentraciones indicadas, conjuntamente con 25 µl de péptido IGF-1 ó IGF-2 marcado con I¹²⁵ prediluido, a 200 µl de suspensión celular, y se incubó durante 3,5 horas a 4°C. Las células se aislaron nuevamente mediante centrifugación durante 5 minutos a 2.000 rpm (Eppendorf, 5415C) y se eliminó el sobrenadante. Tras lavar dos veces en 1 ml de tampón de unión, las células se resuspendieron en 1 ml de tampón de unión y se transfirieron a tubos de centelleo. Se midió la cantidad de péptido radioactivo unido a los receptores de superficie celular en un contador de centelleo.

40 Las curvas de IC₅₀ resultantes que demuestran la capacidad del anticuerpo de inhibir la unión del péptido IGF-1 e IGF-2 al receptor de IGF-1 se muestran en las figs. 5 y 6. El valor medio de IC₅₀ para el anticuerpo 18 era de 0,3 nM. Los resultados para el anticuerpo αIR3 se muestran en la fig. 7. No pudo observarse inhibición detectable de la unión de IGF-2.

Ejemplo 7

Ensayo de competición de anticuerpos para la unión a IGF-1R

45 Para un mapeo de epítomos de los anticuerpos monoclonales anti-IGF-1R, se seleccionó un formato similar al de la medición de afinidad (Ejemplo 2), aunque se preincubó IGF-1R durante por lo menos 0,5 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo en solución. Se inyectó esta mezcla y se detectó la unión (o inhibición) de IGF-1R. Este ensayo permite medir la actividad inhibidora recíproca de los anticuerpos monoclonales para la unión de IGF-1R. Se encontró que los anticuerpos de la invención competían para la unión a IGF-1R con αIR3, un anticuerpo que es conocido que se une a los anticuerpos 217 a 274 (Gustafson T.A. y Rutter W.J., J. Biol. Chem. 265 (1990) 18663-18667).

Ejemplo 8

Inhibición de la fosforilación mediada por IGF-1 de IGF-1R y de Akt/PKB

60 Con el fin de determinar la capacidad del anticuerpo de la invención de inhibir la activación y la fosforilación del receptor de IGF-1 (IGF-1R), se llevaron a cabo experimentos de competición con el péptido IGF-1 y el análisis de transferencia western posterior con anticuerpos específicos para la tirosina fosforilada.

Se sembraron células tumorales humanas (HT29, NCI H322M, 5×10^4 /ml) en una placa con medio RPMI1640 (PAA, n° de

cat. E15-039) suplementada con L-glutamina 2 mM, 1x aminoácidos no esenciales (Gibco, nº de cat. 11140-035), piruvato sódico 1 mM (Gibco, nº de cat. 11360-039) y FCS inactivado por calor al 0,5% (PAA, nº de cat. A15-771). Para la determinación de los valores de IC₅₀, se inocularon placas de 12 pocillos con 1 ml de células en el medio respectivo para cada experimento y se cultivaron durante dos días a 37°C y con 5% de CO₂.

5 Tras 48 horas de cultivo con medio pobre en suero, se separó cuidadosamente el medio y se sustituyó por concentraciones diferentes de anticuerpo diluidas en el medio respectivo. Tras 5 minutos de incubación a 37°C y con 5% de CO₂, se añadió el péptido IGF-1 a una concentración final de 2 nM y se incubaron nuevamente las células durante 10 minutos bajo las condiciones anteriormente indicadas. Se eliminó cuidadosamente el medio mediante aspiración y se añadieron 100 µl de tampón de lisis frío en cada pocillo (Hepes 50 mM, pH 7,2, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, glicerol al 10%, Triton[®]-X100 al 1%, NaF 100 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM, inhibidor de proteasa Complete[®]). Se desengancharon las células utilizando un raspador celular (Corning, nº de cat. 3010) y el contenido de los pocillos se transfirió a tubos de reacción Eppendorf. Se separaron los fragmentos celulares mediante centrifugación durante 10 minutos a 13.000 rpm y 4°C y se añadió la mitad del sobrenadante a 2x tampón para muestras de Laemmli en una proporción 1:1 (v/v). Para la inmunoprecipitación de IGF-1R, el sobrenadante restante de los lisados celulares se sometió a una centrifugación de clarificación (10 minutos a 13.000 rpm y 4°C) inmediatamente antes de añadir 1 µl de un anticuerpo policlonal contra IGF-1Rβ (C-20, Santa Cruz Biotechnologies) o un anticuerpo monoclonal murino (IgG) que reconoce un epítipo dentro de los aminoácidos 440 a 586 del dominio extracelular (cadena α) del receptor de tipo 1 de IGF humano (mAb 24-55, GroPep). Tras 2 horas de incubación a 4°C en un tubo de reacción Eppendorf giratorio, se añadieron 25 µl de perlas de proteína G-Sepharose[®] (Amersham Biosciences, nº de cat. 17-0618-01), seguido de otra etapa de incubación de 1 hora a 4°C. Las perlas con complejos de anticuerpo-proteína unidos se aislaron mediante centrifugación (1 minuto a 2.000 rpm y 4°C) y se lavaron tres veces con tampón de lavado (tampón de lisis con sólo Triton[®]-X100 al 0,1%). Tras la ebullición de las perlas en tampón para muestras de Laemmli, se separaron las proteínas celulares mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN[®] BA 85, Schleicher&Schuell) mediante transferencia western semiseca.

Se utilizó un anticuerpo específico de fosfotirosina (Upstate, clon 4G10, nº de cat. 05-321) para determinar el estado de fosforilación del IGF-1R inmunopurificado. Para la detección de Akt/PKB fosforilado, se aplicó un anticuerpo con especificidad para Ser473 fosforilada (Cell Signalling, nº de cat. 9271).

El bloqueo observado de la fosforilación inducida por IGF-1 de tanto IGF-1R como Akt/PKB se muestra en la fig. 8.

Ejemplo 9

Inducción de la regulación negativa mediada por anticuerpos de IGF-1R in vitro

Con el fin de detectar efectos del anticuerpo de la invención sobre la cantidad de receptor de IGF-1 (IGF-1R) en células tumorales, se llevaron a cabo experimentos de curso temporal y el análisis de transferencia western posterior con anticuerpos específicos para IGF-1R.

Se sembraron células tumorales humanas (HT29, 5x10⁴ células/ml) en una placa con medio RPMI1640 (PAA, nº de cat. E15-039) suplementada con L-glutamina 2 mM, 1x aminoácidos no esenciales (Gibco, nº de cat. 11140-035), piruvato sódico 1 mM (Gibco, nº de cat. 11360-039) y FCS inactivado por calor al 10% (PAA, nº de cat. A15-771). Para cada periodo de incubación, se inoculó una placa de 12 pocillos con 1 ml de células en el medio respectivo para cada experimento y se cultivó durante 24 horas a 37°C y con 5% de CO₂.

Se eliminó cuidadosamente el medio y se sustituyó por concentraciones diferentes de anticuerpo diluidas en el medio respectivo. En dos pocillos de control se sustituyó el medio por medio sin anticuerpo o por medio con un anticuerpo de control (AB-1, Oncogene, nº de cat. GR11). Las células se incubaron a 37°C y con 5% de CO₂ y se extrajeron placas individuales para el procesamiento adicional tras 15 minutos, 24 horas y 48 horas.

Se eliminó cuidadosamente el medio mediante aspiración y se añadieron 100 µl de tampón de lisis frío en cada pocillo (Hepes 50 mM, pH 7,2, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, glicerol al 10%, Triton[®]-X100 al 1%, NaF 100 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM, inhibidor de proteasa Complete[®]). Se desengancharon las células utilizando un raspador celular (Corning, nº de cat. 3010) y el contenido de los pocillos se transfirió a tubos de reacción Eppendorf. Se separaron los fragmentos celulares mediante centrifugación durante 10 minutos a 13.000 rpm y 4°C y se añadió el sobrenadante a 2x tampón para muestras de Laemmli en una proporción 1:1 (v/v). Se separaron las proteínas celulares mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN[®] BA 85, Schleicher&Schuell, nº de cat. 10 401196) mediante transferencia western semiseca.

Se utilizó un anticuerpo específico para IGF-1R (C-20, Santa Cruz Biotechnologies, nº de cat. sc-713) para determinar

los niveles de proteína de IGF-1R.

Se observó la regulación negativa de IGF-1R inducida por el anticuerpo de la invención tras menos de 24 horas de la adición del anticuerpo.

5

Ejemplo 10

Inhibición de la unión de la insulina a células 3T3 que expresan receptor de insulina humano

10 Con el fin de determinar si el anticuerpo de la invención también bloqueaba la unión de la insulina al receptor de insulina (IR), se llevaron a cabo experimentos de competición con un péptido ligando marcado radioactivamente.

Se sembraron en placa en medio de Dulbecco MEM (DMEM) rico en glucosa (PAA, nº de cat. E15-009) suplementado con L-glutamina 2 mM (Gibco, nº de cat. 25030-025) y FCS inactivado por calor al 10% (PAA, nº de cat. A15-771) células 15 3T3 (1×10^5 /ml) que expresaban recombinantemente un número elevado ($>10^5$) de IR humanos. Se inocularon seis botellas en el formato T175 con 20 ml de células en el medio respectivo en cada experimento y se cultivaron durante dos días a 37°C y con 5% de CO₂ para obtener monocapas celulares confluyentes.

20 Para recoger células individuales, se añadieron 2 ml de 1x tripsina/EDTA (Gibco, nº de cat. 25300-054) en cada matraz T175 y se realizó un seguimiento del desenganchamiento de las células utilizando un microscopio. Se recogieron las células y se añadió el medio con FCS al 10% indicado anteriormente hasta un volumen total de 50 ml. Se aislaron nuevamente las células mediante centrifugación durante 10 minutos a 1.000 rpm y se resuspendieron en 50 ml de tampón de unión (NaCl 120 mM, KCl 5 mM, MgSO₄ 1,2 mM, EDTA 1 mM, D(+)-glucosa 10 mM, NaAc 15 mM, Hepes 100 mM, pH 7,6, BSA al 1%). Se realizó un recuento de las células, se aislaron nuevamente mediante centrifugación y se 25 ajustó con tampón de unión hasta 1×10^6 células/ml.

Se diluyó en tampón de unión péptido insulina marcado con ¹²⁵I (Amersham, nº de cat. IM166, ~2.000 Ci/mmol), solubilizado en CH₃COOH al 0,1%, hasta una actividad final de 4×10^5 pulsos/(minuto*ml). Se añadieron 75 µl de anticuerpo conjuntamente con 25 µl de péptido insulina marcado con ¹²⁵I prediluido, a 200 µl de suspensión celular 30 (concentración final de anticuerpo: 200 nM) y se incubó durante 3,5 horas a 4°C. Las células se aislaron nuevamente mediante centrifugación durante 5 minutos a 2.000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Tras lavar dos veces en 1 ml de tampón de unión, las células se resuspendieron en 1 ml de tampón de unión y se transfirieron a tubos de centelleo. Se midió la cantidad de péptido radioactivo unido a los receptores de superficie celular en un contador de centelleo.

35 Los resultados demuestran que el anticuerpo de la invención no interfiere con la unión del ligando de insulina al receptor de insulina (fig. 9).

Ejemplo 11

40 Ninguna estimulación de IGF-1R y de la fosforilación de Akt/PKB

Con el fin de excluir las actividades estimuladoras de IGF-1R del anticuerpo de la invención, se determinó la fosforilación de IGF-1R en ausencia de ligando de IGF-1 aunque en presencia del anticuerpo de la invención y un anticuerpo de referencia (αIR3, Oncogene, Alemania). Lo anterior se llevó a cabo mediante un análisis de transferencia western con 45 anticuerpos específicos del estado de fosforilación. Se sembraron en placa células 3T3 (ATCC nº CRL 1658) transfectadas con IGF-1R (5×10^4 células/ml, Pietrkowski Z. *et al.*, Cell Growth Differ. 4:199-205, 1992), en medio de Dulbecco MEM (DMEM) rico en glucosa (PAA, nº de cat. E15-009) suplementado con L-glutamina 2 mM (Gibco, nº de cat. 25030-024) y FCS inactivado por calor al 0,5% (PAA, nº de cat. A15-771) o células tumorales humanas (HT29, NCI H322M, 5×10^4 /ml) en medio RPMI1640 (PAA, nº de cat. E15-039) suplementado con L-glutamina 2 mM, 1x aminoácidos no esenciales (Gibco, nº de cat. 11140-035), piruvato sódico 1 mM (Gibco, nº de cat. 11360-039) y FCS inactivado por 50 calor al 0,5% (PAA, nº de cat. A15-771). Para la determinación de los valores de IC₅₀, se inocularon placas de 12 pocillos con 1 ml de células en el medio respectivo para cada experimento y se cultivaron durante dos días a 37°C y con 5% de CO₂.

55 Tras 48 horas de cultivo con medio pobre en suero, se separó cuidadosamente el medio y se sustituyó por concentraciones diferentes de anticuerpo diluidas en el medio respectivo. Las células se incubaron durante 15 minutos bajo las condiciones indicadas anteriormente. Se eliminó cuidadosamente el medio mediante aspiración y se añadieron 100 µl de tampón de lisis frío en cada pocillo (Hepes 50 mM, pH 7,2, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, glicerol al 10%, Triton-X100 al 1%, NaF 100 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM, inhibidor de proteasa Complete®). Las células se desengancharon utilizando un raspador celular (Corning, nº de cat. 3010) y el contenido de los pocillos se transfirió a tubos de reacción Eppendorf. Se separaron los fragmentos celulares mediante centrifugación durante 10 minutos a 13.000 rpm y 4°C (centrífuga 60

Eppendorf 5415R) y se añadió la mitad del sobrenadante a 2x tampón para muestras de Laemmli en una proporción 1:1 (v/v). Para la inmunoprecipitación de IGF-1R, el sobrenadante restante de los lisados celulares se sometió a una centrifugación de clarificación (10 minutos a 13.000 rpm y 4°C) inmediatamente antes de la adición de 1 µl de un anticuerpo contra IGF-1R (C-20, Santa Cruz Biotechnologies, nº de cat. sc-713 ó mAb 24-55, GroPep, nº de cat. MAD1).
 5 Tras 2 horas de incubación a 4°C en un tubo de reacción Eppendorf giratorio, se añadieron 25 µl de perlas de proteína G-Sepharose™ (Amersham Biosciences, nº de cat. 17-0618-01), seguido de otra etapa de incubación de 1 hora a 4°C. Se aislaron mediante centrifugación (1 minuto a 2.000 rpm y 4°C) las perlas con complejos de anticuerpo-proteína unidos y se lavaron tres veces con tampón de lavado (tampón de lisis con sólo Triton-X100 al 0,1%). Tras la ebullición de las perlas en tampón para muestras de Laemmli, se separaron las proteínas celulares mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN BA 85, Schleicher&Schuell, nº de cat. 10 401196) mediante transferencia western semiseca.

Se utilizó un anticuerpo específico de fosfotirosina (Upstate, clon 4G10, nº de cat. 05-321, que reconocía las proteínas con tirosinas fosforiladas), para determinar el estado de fosforilación del IGF-1R inmunopurificado. Para la detección de Akt/PKB fosforilado, se aplicó un anticuerpo contra Akt1 con especificidad para Ser473 fosforilada (Cell Signalling, nº de cat. 9271).

Se observó que la quinasa Akt/PKB más allá de la ruta de señalización de IGF-1R resultaba significativamente activada por el anticuerpo de referencia a concentraciones superiores a 5 nM, pero no por el anticuerpo de la concentración a concentraciones de hasta 10.000 nM. Se muestran los resultados en las figs. 10 y 11 (HM=medio pobre en suero con FCS al 0,5%, HM+IGFI=medio pobre en suero con FCS al 0,5% y hIGF-1 10 nM).

Ejemplo 12

25 Inducción de la regulación negativa del receptor en modelos de xenoinjerto H322M

Se indujeron tumores en ratones desnudos y se trataron una vez con concentraciones diferentes del anticuerpo de la invención. Veinticuatro horas después del tratamiento, se extrajeron los tumores y se homogeneizaron bajo nitrógeno líquido. Se añadió tampón de lisis frío (Hepes 50 mM, pH 7,2, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, glicerol al 10%, Triton-X100 al 1%, NaF 100 mM, Na₃VO₄ 1 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM, inhibidor de proteasa Complete TM, PMSF 1 mM) en una proporción de volumen de tampón a peso de tumor de 3:1 y se mezcló uniformemente con el homogenado tumoral en descongelación. Tras solubilizar el tejido durante 15 minutos en hielo, se separaron los fragmentos insolubles mediante centrifugación durante 10 minutos a 13.000 rpm y 4°C (centrífuga Eppendorf 5415R). Se determinó la concentración de proteínas de las muestras con los reactivos Micro BCA™ (Pierce) y se añadió tampón de lisis para ajustar a concentraciones iguales. Se añadió parte del sobrenadante a 2x tampón para muestras de Laemmli en una proporción 1:1 (v/v). Se separaron las proteínas celulares mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN BA 85, Schleicher&Schuell, nº de cat. 10 401196) mediante transferencia western semiseca. Se utilizó un anticuerpo específico de IGF-1R (C-20, Santa Cruz Biotechnologies, nº de cat. sc-713) para detectar el IGF-1R.

40 Tras el tratamiento con el anticuerpo de la invención, los presentes inventores observaron una reducción dependiente de la concentración de los niveles del IGF-1R, con una EC₅₀ estimada de 0,6 mg/kg (figura 12).

Ejemplo 13

45 ELISA de unión de C1q

Introducción

50 Para determinar la capacidad de los anticuerpos según la invención de fijar C1q, se utilizó una ELISA. C1q es parte del sistema inmunológico adaptativo y, tras la unión a complejos inmunológicos, desencadena la activación secuencial de varios zimógenos. Los enzimas, a su vez, provocan el corte de moléculas C3, lo que puede resultar en la aparición de reacciones inflamatorias, la opsonización de partículas foráneas o aberrantes y la lisis de las membranas celulares.

55 En principio, se recubrió la placa ELISA con intervalos de concentración del anticuerpo, a la que se añadió C1q humano. Se detectó la unión de C1q mediante un anticuerpo dirigido contra C1q humano, seguido de un conjugado marcado con peroxidasa.

Materiales y métodos:

60 Los anticuerpos 18, 8 y 23, y los anticuerpos de control, se sometieron a ensayo a concentraciones de 10, 5, 1 y 0,5 µg/ml. La Tabla 1 muestra las especificidades de las muestras sometidas a ensayo. A modo de control negativo se utilizó

una IgG4 humana (CLB, solución madre de 0,5 µg/ml) que se une a C1q muy débilmente. Se incorporó la IgG1 humana a modo de control positivo. Se utilizó una solución madre de C1q humano con una concentración de 2 µg/ml. Para la detección de C1q, se utilizó un anticuerpo de conejo dirigido contra C1q (Dako) y un anticuerpo IgG anticonejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (Sigma).

5

Cálculos y ajuste de curva

Los cálculos referentes a la unión máxima (Bmax) del HuMAb sometido a ensayo se realizaron utilizando el ajuste de curvas de regresión no lineales (unión de un sitio) utilizando el software Graphpad Prism.

10

Resultados

Los anticuerpos según la invención mostraban una unión dependiente de la dosis de la proteína C1q humana. Se dibujó la densidad óptica a 405 nm (DO 405 nm) frente a las concentraciones de HuMAb y las curvas se ajustaron utilizando la regresión no lineal. Los valores de ajuste óptimo para la unión máxima (Bmax) se indican en la Tabla 2, al igual que el coeficiente de correlación de la curva (R2) y la desviación estándar para cada valor. El coeficiente de correlación más bajo presentaba un valor de 0,950 (IgG4). Con una unión máxima de 0,279, la IgG4 humana (control negativo) mostraba una unión mínima de C1q. Los controles positivos IgG1 e IgG3 se unían ambos a C1q, tal como muestran uniones máximas de 1,729 y 2,223, respectivamente.

15

20

Tabla 2

Unión máxima (Bmax) del HuMAb sometido a ensayo en la ELISA de unión de C1q (n=3)				
Valores de ajuste óptimo	Bmax	Desviación estándar de Bmax	Bondad de ajuste R2	Desviación estándar R2
IgG1	1,729	0,166	0,983	0,010
IgG3	2,223	0,947	0,995	0,005
IgG4	0,279	0,280	0,950	0,041
Anticuerpo 18	1,670	0,601	0,988	0,005

También se indican el coeficiente de correlación (R2) y la desviación estándar.

En comparación con la unión de C1q de la IgG4 humana (control negativo, con una D.O. de 0,279), todos los anticuerpos sometidos a ensayo son igualmente capaces de fijar C1q.

25

Ejemplo 14

Determinación de las funciones efectoras mediadas por anticuerpos de HuMAbs anti-IGF-1R

30

Con el fin de determinar la capacidad de los anticuerpos HuMAb generados para inducir mecanismos efectoros inmunológicos, se llevaron a cabo estudios de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

35

Para estudiar la CDC (National Cancer Institute, línea celular de adenocarcinoma pulmonar), se marcaron células H322M, H460 y NIH 3T3 (2 a 6×10^6) con 100 µCi de ^{51}Cr durante 45 a 120 minutos (Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido, nº de cat. CJS11). Tras el marcaje, las células se lavaron dos veces con 40 ml de PBS y se centrifugaron durante 3 minutos a 1.500 rpm. A continuación, se sembraron placas con 5.000 células en cada pocillo, en una placa de fondo redondo en un volumen de 50 µl. Se añadieron anticuerpos a una concentración final comprendida entre 25 y 0,1 µg/ml en un volumen de 50 µl de medio de cultivo celular a 50 µl de suspensión celular, y se incubaron durante 30 a 60 minutos. Tras la incubación, se eliminó el exceso de anticuerpo mediante el lavado dos veces con PBS. Se añadieron 100 µl de una agrupación activa o inactiva (30 minutos a 56°C) de sueros humano, de cobaya, de conejo o de ratones desnudos, diluido entre 1/3 y 1/30, y las células se incubaron durante 3 horas, después de lo cual las células se peletizaron a 1.500 rpm durante 3 minutos. Se recolectaron 100 µl del sobrenadante, se transfirieron a tubos de polipropileno y se realizó un recuento en un contador y.

40

45

Para estudiar los efectos de los anticuerpos en la ADCC, se marcaron células H322M, H460 y NIH 3T3 u otras células adecuadas que expresasen IGF-1R ($2 \times 6 \times 10^6$) con 100 μ Ci de ^{51}Cr durante 45 a 120 minutos (Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido, n° de cat. CJS11), se lavaron dos veces con 40 ml de PBS y se centrifugaron durante 3 minutos a 1.500 rpm. Se sembraron placas con 5.000 células en cada pocillo, en una placa de fondo redondo en un volumen de 50 μ l. Se añadieron anticuerpos HuMAb a una concentración final comprendida entre 25 y 0,1 μ g/ml en un volumen de 50 μ l de medio de cultivo celular a 50 μ l de suspensión celular, y se incubaron durante 15 minutos. A continuación, se añadieron 50 μ l de células efectoras, PBMCs recién aisladas o células efectoras purificadas a partir de capas leucoplaquetarias, en una proporción E:T comprendida en el intervalo de entre 100:1 y 5:1. Las placas se centrifugaron durante 2 minutos a una velocidad de entre 500 y 700 rpm, y se incubaron durante la noche a 37°C. Tras la incubación, las células se peletizaron durante 3 minutos a 1.500 rpm y se recolectaron 100 μ l, se transfirieron a tubos de polipropileno y se realizó un recuento en un contador y.

La magnitud de la lisis celular mediante CDC o ADCC se expresa como % de la liberación máxima de radioactividad de las células diana lisadas con detergente, corregida para la liberación espontánea de radioactividad de las células diana respectivas.

Ejemplo 15

Inhibición del crecimiento de tumores H322M

Se investigaron los efectos del anticuerpo 18 *in vivo* mediante la inducción de tumores en ratones desnudos atímicos según métodos establecidos. Se coinyectaron células H322M NSCLS humanas conjuntamente con Matrigel subcutáneamente en ratones nu (nu/nu) atímicos de 6 a 7 semanas de edad. Con este fin, se concentraron 5×10^6 células H322M en 100 μ l de medio de cultivo y se mezclaron con 100 μ l de Matrigel. Se inyectaron 200 μ l de esta mezcla en los flancos derechos de los ratones. Se calculó el volumen tumoral mediante la medición de los diámetros tumorales con calibradores de Vernier dos veces a la semana según la fórmula publicada por primera vez por Geran *et al.* ("Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems", Cancer Chemother. Rep. 11:301, 1972), en la que volumen tumoral [mg]=(longitud x anchura)². Se administró anticuerpo intraperitonealmente (i.p.) a una concentración de 10 ml/kg. Se inició el tratamiento con dosis dobles del anticuerpo administradas en volúmenes dobles. Se indujeron tumores en ratones desnudos tal como se ha indicado anteriormente. Tras crecer los tumores hasta un volumen medio de 160 mg, los ratones se trataron intraperitonealmente seis veces una vez a la semana con 6, 0,6 y 0,06 mg/kg de anticuerpo en forma de dosis sucesivas con 12, 1,2 y 0,12 mg/kg como dosis inicial de saturación proporcionada una vez el primer día de tratamiento. La figura 13 ilustra los volúmenes tumorales medidos durante el tratamiento hasta el día 67, momento en que se sacrificaron los animales y se terminó el experimento. El experimento demuestra que el bloqueo del eje IGF-1R con mAb 18 anti-IGF-1R rhu resulta en eficacia antitumoral al administrarlo en forma de un agente individual a concentraciones de 6 y 0,6 mg/kg. En contraste, la concentración de 0,06 mg/kg no presentó ningún efecto sobre el crecimiento tumoral.

Además, el anticuerpo 18 se sometió a ensayo en combinación con gemcitabina en el mismo modelo. Se indujeron tumores tal como se ha indicado anteriormente y se inició el tratamiento tras establecerse y crecer los tumores hasta una media de 170 mm³ en todos los grupos. Se administró anticuerpo una vez a la semana i.p. a las concentraciones de 6 y 0,6 mg/kg y en combinación con 62 mg/kg de gemcitabina a una concentración de 0,6 mg/kg. Se administró gemcitabina en un ciclo, es decir, cada tercer día un total de cuatro veces. Nuevamente, se inició el tratamiento mediante la administración de dosis dobles del anticuerpo. La figura 14 muestra el tamaño tumoral en relación a los diversos tratamientos durante el tiempo. El experimento demuestra que el tratamiento con anticuerpo 18 administrado una vez cada siete días inhibe el crecimiento tumoral por sí solo e incrementa la efectividad de la gemcitabina, un compuesto antimetabólico conocido.

Ejemplo 16

Inhibición del crecimiento de tumores 3T3

Se indujeron tumores en ratones desnudos esencialmente tal como se describe en el Ejemplo 15, excepto en que se utilizaron fibroblastos 3T3 murinos que sobreexpresaban IGF-1R humano. Se trataron ratones con tumores establecidos de aproximadamente 180 mg por vía intraperitoneal una vez a la semana en 7 ocasiones con 18, 6 ó 0,6 mg/kg de anticuerpo 18. Nuevamente, se inició el tratamiento con dosis dobles de anticuerpo administradas en forma de dosis inicial de saturación (36, 12 y 1,2 mg/kg). El experimento demuestra que, mediante el tratamiento con el anticuerpo, puede retrasarse el crecimiento tumoral al administrarse a concentraciones de 18 y 6 mg/kg una vez a la semana (figura 15).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG
<120> Anticuerpos contra el receptor del factor I de crecimiento similar a insulina y usos de los mismos
5 <130> 21695
<150> EP 03015526
<151> 2003-07-10

<160> 8
10 <170> PatentIn versión 3.2
<210> 1
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens
15
<400> 1

<210> 2
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens

<211> 108

<400> 2
25

ES 2 360 454 T3

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

Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

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

Leu Val Ser Val Ser Ser
 115

<210> 2

<211> 118

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

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

- <210> 5
- <211> 990
- 5 <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (1)..(990)
- <400> 5

gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag 48
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac 96
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc 144
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc 192
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc 240
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys 85 90 95	288
aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys 100 105 110	336
cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro 115 120 125	384
aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys 130 135 140	432
gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp 145 150 155 160	480
tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu 165 170 175	528
gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu 180 185 190	576
cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn 195 200 205	624
aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly 210 215 220	672
cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu 225 230 235 240	720
ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr 245 250 255	768
ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn 260 265 270	816

```

aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc      864
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
      275                      280                      285

ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac      912
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
      290                      295                      300

gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg      960
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
      305                      310                      315                      320

cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa      990
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
      325                      330

```

<210> 6
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 6

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1          5          10          15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20          25          30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35          40          45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50          55          60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65          70          75          80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85          90          95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100         105         110

```

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 7
 <211> 321
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (1)..(321)

<400> 7

cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag	48
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu	
1 5 10 15	
cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc	96
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe	
20 25 30	
tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa	144
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln	
35 40 45	
tcg ggt aac tca cag gag agc gtc aca gag cag gac agc aag gac agc	192
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser	
50 55 60	
acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag	240
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu	
65 70 75 80	
aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg	288
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser	
85 90 95	
ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt	321
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
100 105	

15 <210> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <211> 107

<400> 8

ES 2 360 454 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo ligante de IGF-1R humano, caracterizado porque comprende:
- 5 a) una cadena pesada de anticuerpo que comprende como CDRs, la CDR1 de aminoácidos 31 a 35, la CDR2 de aminoácidos 50 a 66, y la CDR3 de aminoácidos 99 a 107 de secuencia SEC ID nº 1, y una cadena ligera de anticuerpo que comprende como CDRs, la CDR1 de aminoácidos 24 a 34, la CDR2 de aminoácidos 50 a 56 y la CDR3 de aminoácidos 89 a 98 de secuencia SEC ID nº 2, o
- 10 b) una cadena pesada de anticuerpo que comprende como CDRs, la CDR1 de aminoácidos 31 a 35, la CDR2 de aminoácidos 50 a 66, y la CDR3 de aminoácidos 99 a 107 de secuencia SEC ID nº 3, y una cadena ligera de anticuerpo que comprende como CDRs, la CDR1 de aminoácidos 24 a 34, la CDR2 de aminoácidos 50 a 56 y la CDR3 de aminoácidos 89 a 98 de secuencia SEC ID nº 4.
2. Anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizado porque es un anticuerpo humano o humanizado.
3. Anticuerpo según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por una afinidad de entre aproximadamente 10-13 y 10-9 M (KD).
- 15 4. Anticuerpo según la reivindicación 1, obtenible a partir de la línea celular de hibridoma <IGF-1R> HUMAB clon 18 (DSM nº ACC 2587) o <IGF-1R> HUMAB clon 22 (DSM nº ACC 2594).
5. Utilización de un anticuerpo según las reivindicaciones 1 a 4 para la preparación de una composición farmacéutica.
6. Composición farmacéutica que contiene un anticuerpo según las reivindicaciones 1 a 4.
- 20 7. Líneas celulares de hibridoma <IGF-1R> HUMAB clon 18 (DSM nº ACC 2587) y <IGF-1R> HUMAB clon 22 (DSM nº ACC 2594).
8. Método para la preparación de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según las reivindicaciones 1 a 4.
9. Ácido nucleico codificante de un anticuerpo ligante de IGF-1R humano, caracterizado porque comprende:
- 25 a) una cadena pesada de anticuerpo que comprende como CDRs, la CDR1 de aminoácidos 31 a 35, la CDR2 de aminoácidos 50 a 66, y la CDR3 de aminoácidos 99 a 107 de secuencia SEC ID nº 1, y una cadena ligera de anticuerpo que comprende como CDRs, la CDR1 de aminoácidos 24 a 34, la CDR2 de aminoácidos 50 a 56 y la CDR3 de aminoácidos 89 a 98 de secuencia SEC ID nº 2, o
- 30 b) una cadena pesada de anticuerpo que comprende como CDRs, la CDR1 de aminoácidos 31 a 35, la CDR2 de aminoácidos 50 a 66 y la CDR3 de aminoácidos 99 a 107 de secuencia SEC ID nº 3, y una cadena ligera de anticuerpo que comprende como CDRs, la CDR1 de aminoácidos 24 a 34, la CDR2 de aminoácidos 50 a 56 y la CDR3 de aminoácidos 89 a 98 de secuencia SEC ID nº 4.
10. Vector de expresión que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 9, capaz de expresar dicho ácido nucleico en una célula huésped procariótica o en una célula huésped CHO, NS0, SP210, H3K293, COS o de levadura.
- 35 11. Célula huésped procariótica o célula huésped CHO, NS0, SP210, H3K293, COS o levadura que comprende el vector según la reivindicación 10.
12. Método para la producción de un polipéptido ligante del IGF-1R humano, caracterizado por la expresión de un ácido nucleico codificante de una cadena pesada de anticuerpo y un ácido nucleico codificante de una cadena ligera de anticuerpo según la reivindicación 9 en una célula huésped procariótica o en una célula huésped CHO, NS0, SP210, H3K293, COS o levadura y la recuperación de dicho polipéptido a partir de dicha célula.
- 40 13. Anticuerpo según las reivindicaciones 1 a 4 para la utilización como medicamento destinado al tratamiento de un paciente que necesita terapia antitumoral.
14. Anticuerpo para la utilización como medicamento según la reivindicación 13, caracterizado porque el anticuerpo se administra en combinación con un agente citotóxico, un profármaco del mismo o una radioterapia citotóxica.

45

Fig.1

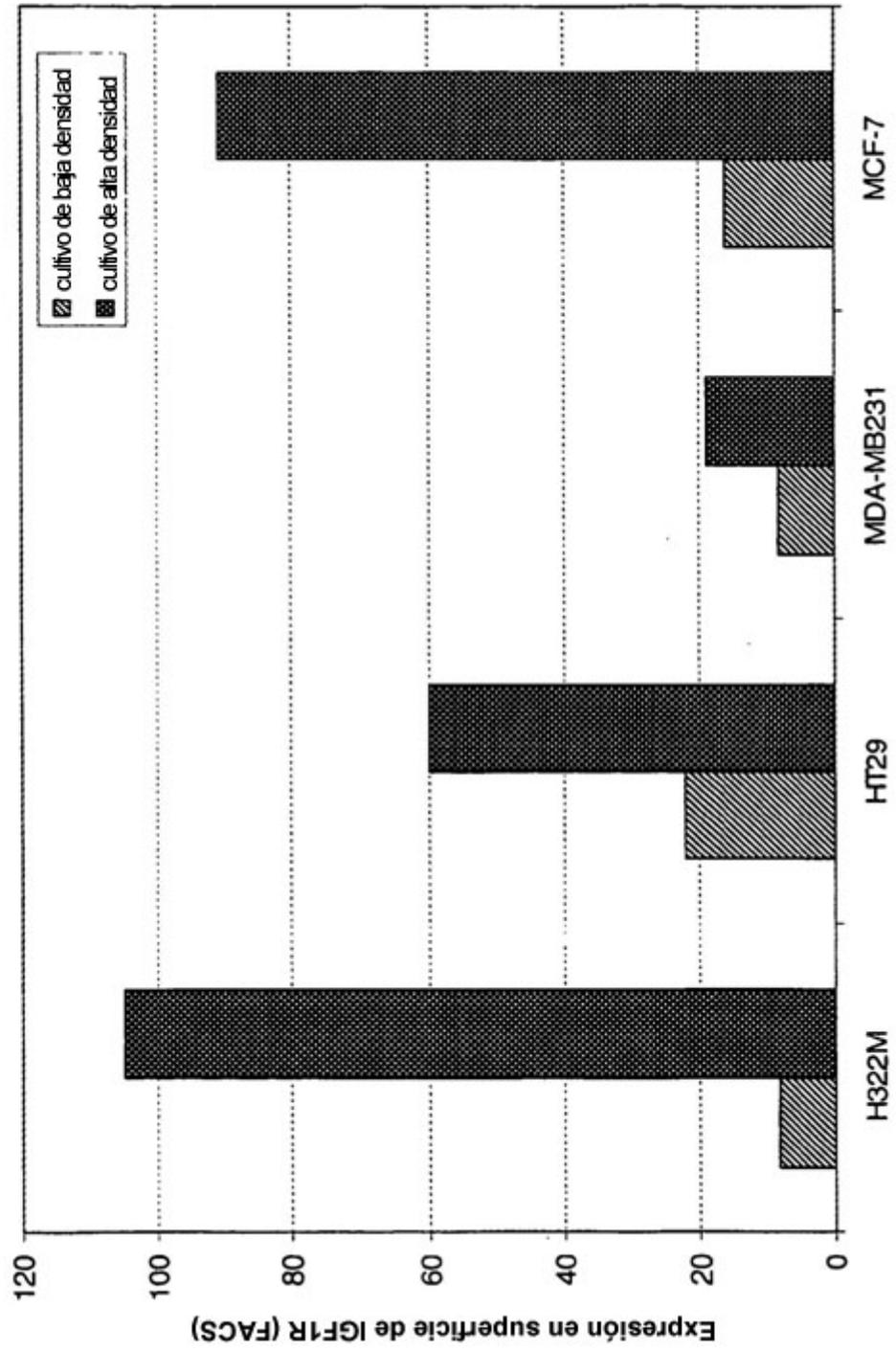


Fig.2

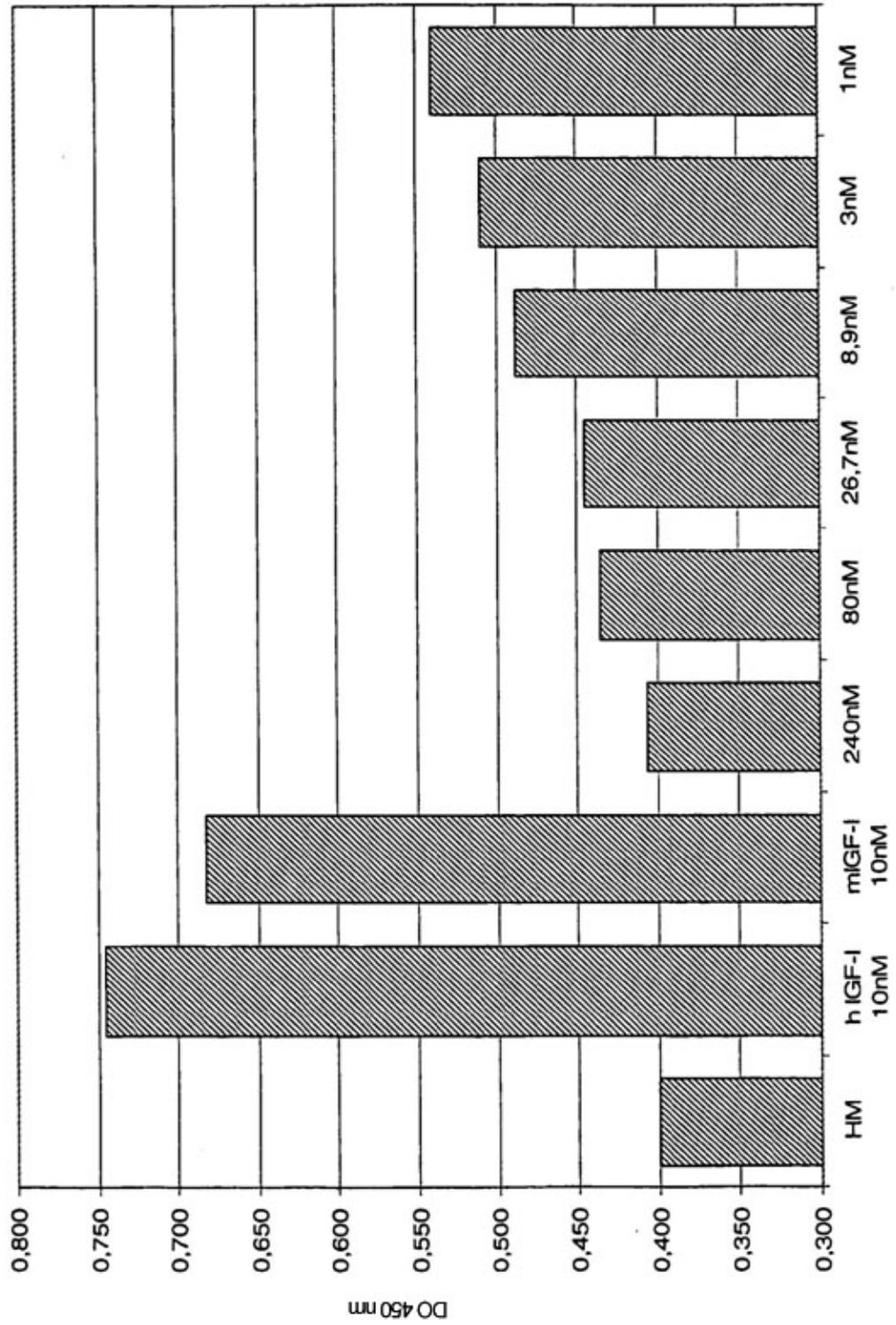


Fig.3

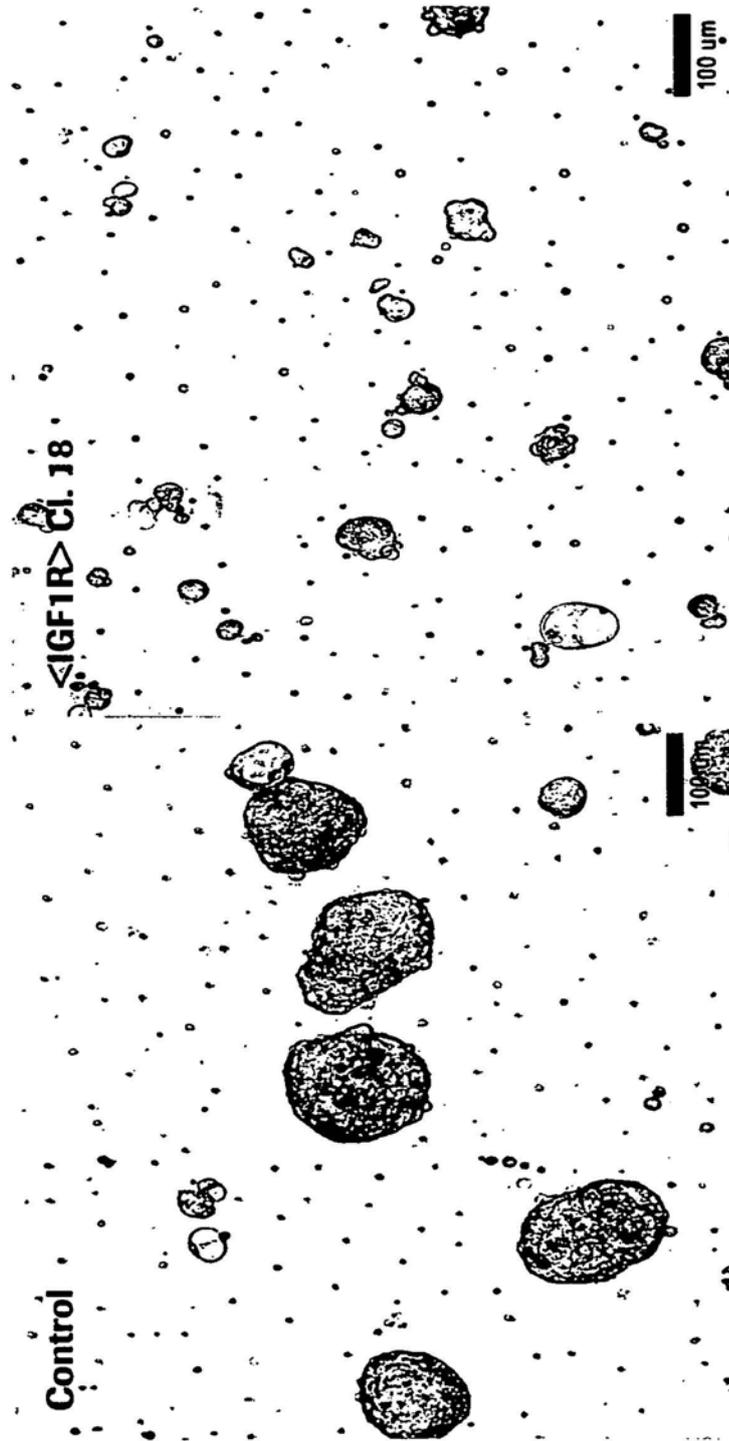


Fig.4

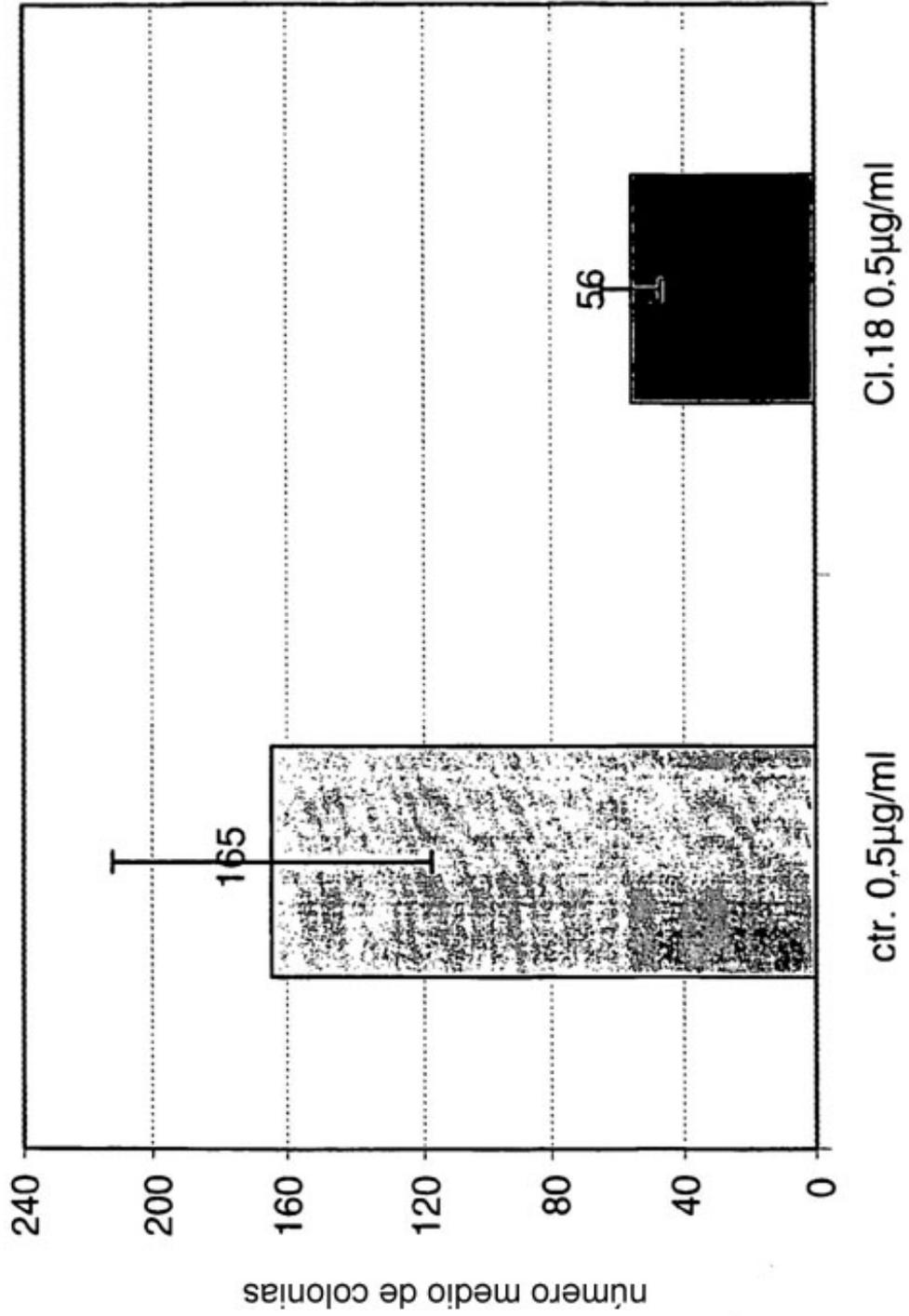


Fig.5

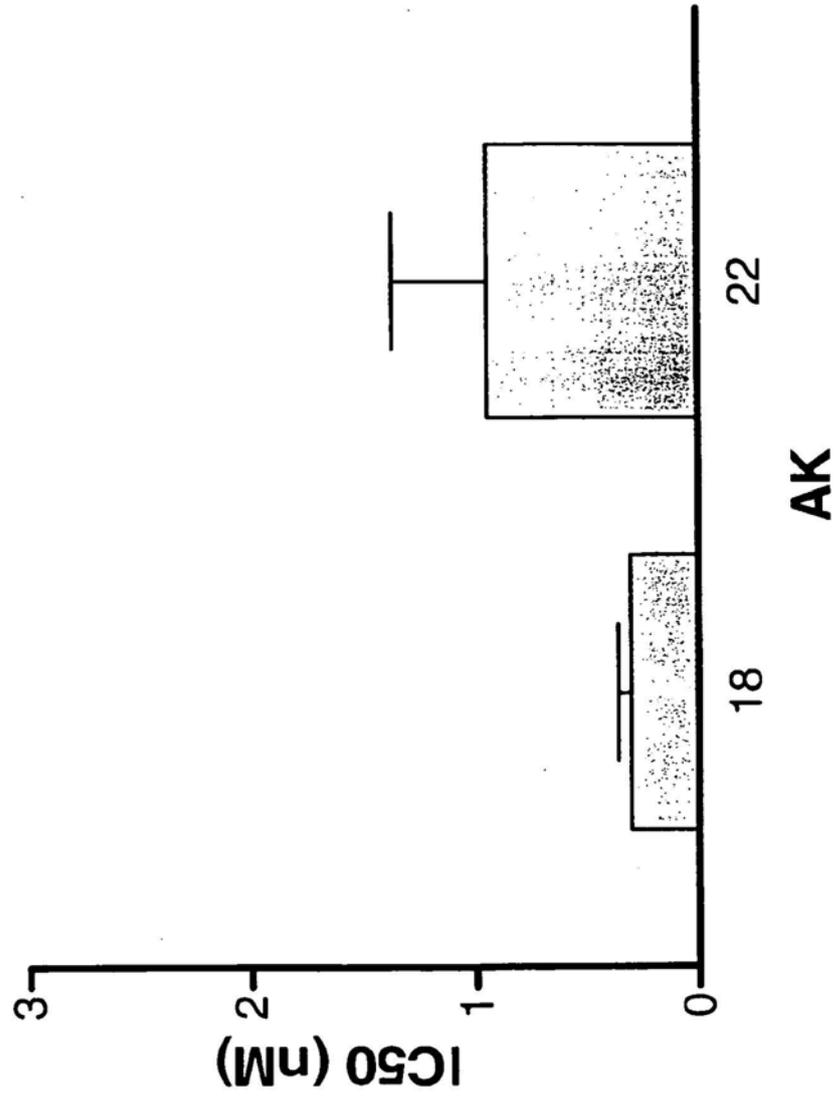


Fig.7

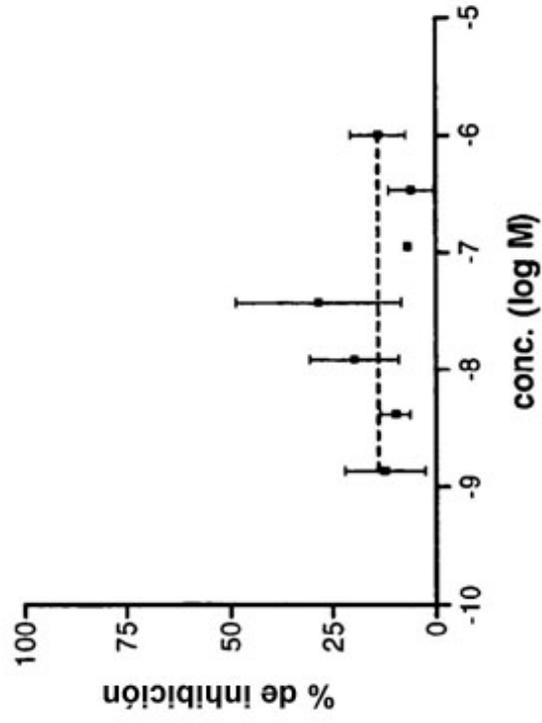


Fig.6

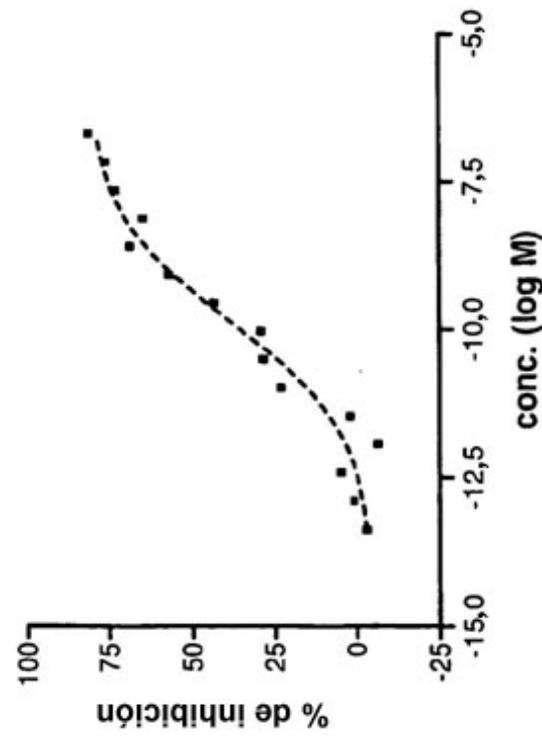


Fig.8

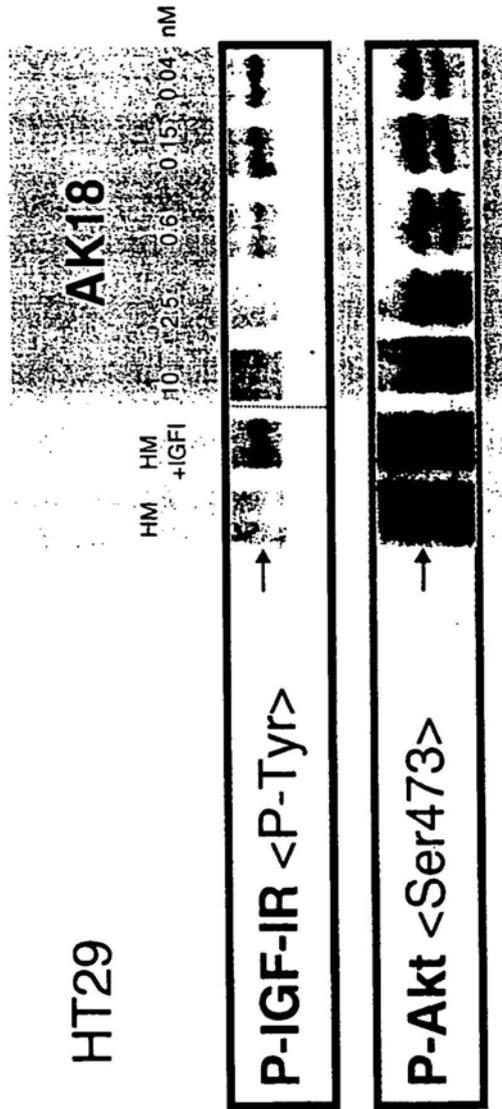


Fig.9

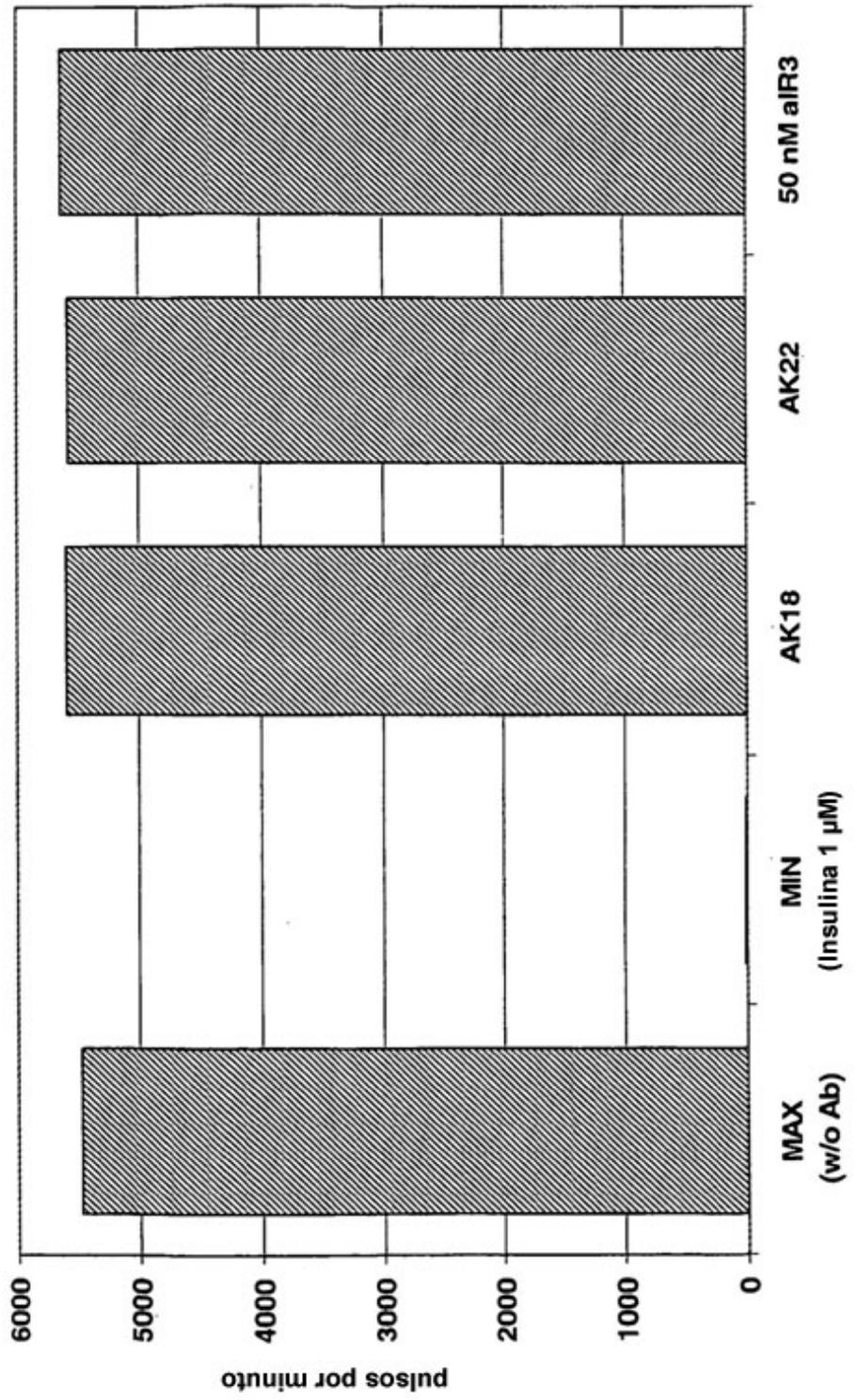


Fig.10

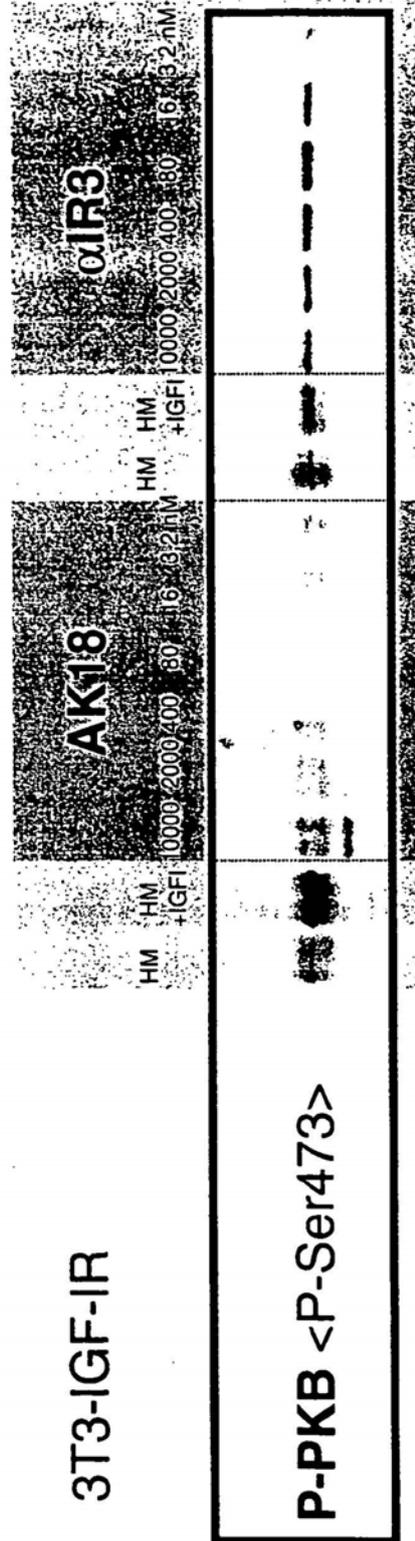


Fig.11

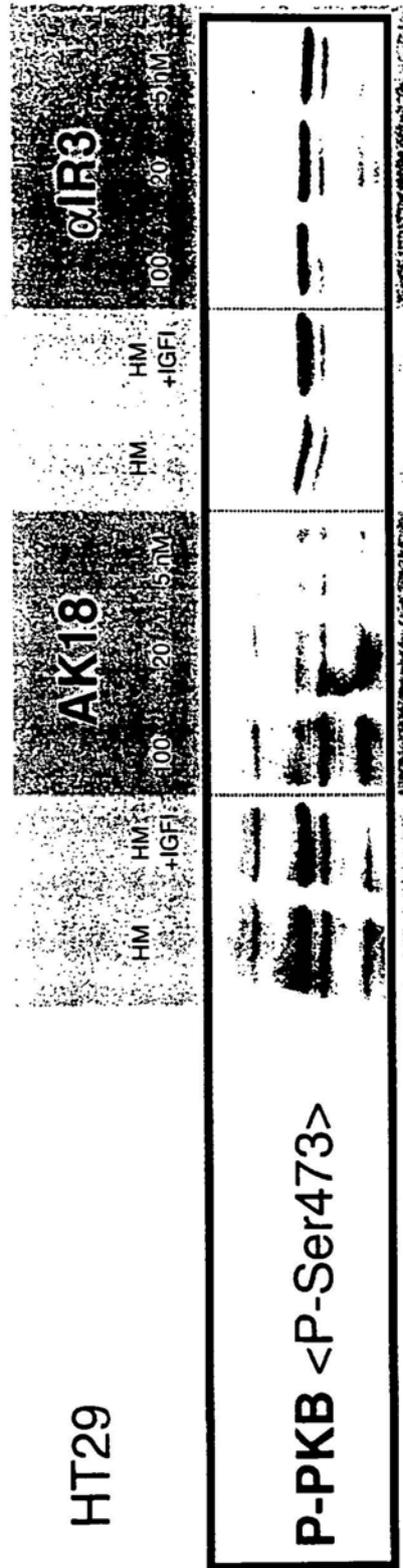


Fig.12

xenoinjerto H322M	vehículo	10 mg/kg	2.5 mg/kg	0.6 mg/kg	0,15 mg/kg
IGF-IR					

Fig. 13

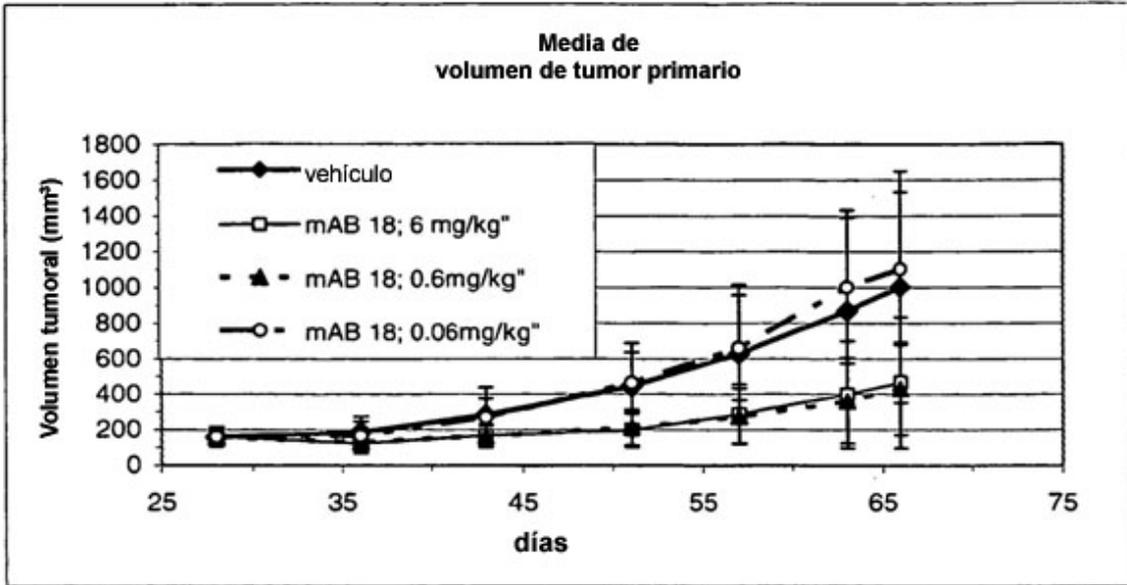


Fig. 14

