

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 014**

51 Int. Cl.:  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**C12N 5/20** (2006.01)  
**C12N 15/13** (2006.01)  
**C12N 15/85** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04725024 .6**  
96 Fecha de presentación: **01.04.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1613658**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.01.2006**

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

30 Prioridad:  
**02.04.2003 US 459837 P**  
**15.04.2003 US 463003 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**15.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**15.06.2012**

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;**  
**WINKEL, Jan van de y**  
**VUGT, Martine van**

74 Agente/Representante:  
**Isern Jara, Jorge**

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).

ES 2 383 014 T3

## DESCRIPCIÓN

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

5 La presente invención se refiere a anticuerpos contra el receptor 1 humano de crecimiento similar a insulina (IGF-IR), a métodos para su producción, a composiciones farmacéuticas que contienen dichos anticuerpos y a usos de los mismos.

10 El receptor del factor I de crecimiento humano similar a insulina (IGF-1R, EC 2.7.112, antígeno CD 221) pertenece a la familia de las proteína tirosina quinasas transmembranales (LeRoith D. *et al.*, *Endocrin. Rev.* 16:143-163, 1995, y Adams T.E. *et al.*, *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1050-1063). IGF-IR se une a IGF-I con una afinidad elevada e inicia la respuesta fisiológica a este ligando *in vivo*. IGF-IR también se une a IGF-II, aunque con una afinidad ligeramente inferior. La sobreexpresión de IGF-IR induce la transformación neoplásica de las células y existen datos que muestran que IGF-IR participa en la transformación maligna de las células y que, por lo tanto, es una diana útil para el desarrollo de agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer (Adams T.E. *et al.*, *Cell. Mol. Life Sci.* 57:1050-1063, 2000).

15 Los anticuerpos de IGF-IR 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. Comm.* 149:276-281, 1987; 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 de IGF-IR también se han descrito en un gran número de otras publicaciones, 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.

20 En particular, el anticuerpo monoclonal de IGF-IR denominado  $\alpha$ IR3 es ampliamente utilizado en la investigación de los procesos mediados por IGF-IR y las enfermedades mediadas por IGF-I tales como el cáncer. Alfa-IR-3 fue descrito por primera vez por Kull F.C., *J. Biol. Chem.* 258:6561-6566, 1983. Desde entonces se han publicado aproximadamente cien publicaciones referidas a la investigación y utilización terapéutica de  $\alpha$ IR3 con respecto a su efecto antitumoral, por sí solo y en combinación con agentes citostáticos, tales como la doxorubicina y la vincristina.  $\alpha$ IR3 es un anticuerpo monoclonal murino que es conocido que inhibe la unión de IGF-I al receptor del IGF-I pero no la unión de IGF-II a IGF-IR. Sin embargo, existen otros anticuerpos (por ejemplo 1H7, Li S.L. *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 49:243-252, 2000) que inhiben la unión de IGF-II a IGF-IR con mayor potencia que la unión de IGF-I. Se describe un resumen del estado de la técnica de los anticuerpos y las propiedades y características de los mismos en Adams T.E. *et al.*, *Cell. Mol. Life Sci.* 57:1050-1063, 2000.

25 La mayoría de los anticuerpos descritos en el estado de la técnica se obtienen del ratón. Lubeck M.D. *et al.*, *J. Immunol.*, 1299-1304, 1985, describen la interacción de proteínas murinas de subclases de IgG con receptores Fc de monocitos humanos. Los anticuerpos IgG2a e IgG3 murinos se unen al FcR humano de manera similar a la IgG1 humana. Dichos anticuerpos, tal como es bien conocido del estado de la técnica, no resultan útiles para la terapia de pacientes humanos si no se realizan 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 de IGF-IR en la patente WO n° 02/053596.

30 Sin embargo, todavía existe una necesidad de anticuerpos de IGF-IR con beneficios convincentes para los pacientes que requieren terapia antitumoral. El beneficio relevante para el paciente es, en términos simples, la reducción del crecimiento tumoral y una prolongación significativa del tiempo hasta la progresión, causada por el tratamiento con el agente antitumorigénico.

Descripción resumida de la invención

La invención comprende un anticuerpo humano de IGF-IR y la inhibición de la unión de IGF-I e IGF-II a IGF-IR, caracterizada porque dicho anticuerpo:

- 5 a) es de isotipo IgG1,  
 b) muestra un valor de IC50 de inhibición de la unión de IGF-I e IGF-II a IGF-IR no superior a 10 nM, y  
 c) comprende una cadena pesada variable de SEC ID nº 1 y una cadena ligera variable de SEC ID nº, una cadena pesada variable de SEC ID nº 3 y una cadena ligera variable de SEC ID nº 4, o una cadena pesada variable de SEC ID nº 5 y una cadena ligera variable de SEC ID nº 6.

10 La invención comprende un anticuerpo humano de IGF-IR y la inhibición de la unión de IGF-I e IGF-II a IGF-IR, caracterizada porque dicho anticuerpo:

- a) es de isotipo IgG1,  
 b) muestra un valor de IC50 de inhibición de la unión de IGF-I e IGF-II a IGF-IR no superior a 10 nM,  
 15 c) comprende una cadena pesada variable derivada de la secuencia de línea germinal DP-61 (GenBank nº M99682) y una cadena ligera variable derivada de la secuencia de línea germinal L15 (GenBank nº K01323), y d) comprende como CDRs de cadena pesada variable, CDR1 (aa nº 31 a nº 35), CDR2 (aa nº 50 a nº 65) y CDR3 (aa nº 98 a nº 108) de SEC ID nº 1, en la que el aminoácido nº 31 puede ser asparagina o serina, y el aminoácido nº 104 puede ser ácido glutámico o ácido aspártico, y como CDRs de cadena ligera variable, CDR1 (aa nº 24 a nº 34), CDR2 (aa nº 50 a nº 56) y CDR3 (aa nº 89 a nº 97) de SEC ID nº 2.

20 El anticuerpo de unión a IGF-IR y que inhibe la unión de IGF-I e IGF-II a IGF-IR se caracteriza porque dicho anticuerpo es de isotipo IgG1 y muestra una proporción entre el nivel de inhibición de la unión de IGF-I a IGF-IR y el nivel de inhibición de la unión de IGF-II a IGF-IR de entre 1:3 y 3:1 e induce una muerte celular mediante ADCC de 20% o más de las células de una preparación de células que expresan IGF-IR tras 24 horas a una concentración de dicho anticuerpo de 100 nM.

30 Los anticuerpos según la invención muestran beneficios para los pacientes que requieren 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 presentan beneficios para los pacientes que sufren de una enfermedad asociada a la 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, particularmente, la unión específica a IGF-IR, la inhibición de la unión de IGF-I e IGF-II a IGF-IR en la proporción anteriormente indicada, siendo del isotipo IgG1, y que presentan una función efectora de ADCC.

35 Preferentemente, además, los anticuerpos según la invención inducen la muerte celular mediante CDC de 20% o más células de una preparación de células que expresan IGF-IR tras 4 horas a una concentración de anticuerpo de 100 nM.

40 Preferentemente, a una concentración de 50 nM, los anticuerpos según la invención inhiben completamente la transducción mediada por IGF-I de señales de IGF-IR en las células tumorales.

La invención también comprende ácidos nucleicos codificantes de anticuerpos. Los polipéptidos codificados son capaces de ensamblarse con la otra cadena de anticuerpo respectiva que se define a continuación:

- 45 - una cadena pesada de anticuerpo que comprende como CDRs, CDR1 (aa nº 31 a nº 35), CDR2 (aa nº 50 a nº 66) y CDR3 (aa nº 98 a nº 108) de SEC ID nº 1, en la que el aminoácido nº 31 puede ser asparagina o serina, el aminoácido nº 66 puede ser glicina o haber sido delecionado, y el aminoácido nº 104 puede ser ácido glutámico o ácido aspártico,  
 - una cadena ligera de anticuerpo que comprende como CDRs, CDR1 (aa nº 18 a nº 34 ó aa nº 24 a nº 34), CDR2 (aa nº 50 a nº 56) y CDR3 (aa nº 89 a nº 98) de SEC ID nº 2, en la que el aminoácido nº 96 puede ser prolina o isoleucina, y el aminoácido nº 98 puede ser fenilalanina o haber sido delecionado.

50 Las CDRs preferentes son: (a) CDR1 (aa nº 31 a nº 35), CR2 (aa nº 50 a nº 65) y CDR3 (aa nº 98 a nº 108) de SEC ID nº 1, en las que el aminoácido nº 31 puede ser asparagina o serina, y el aminoácido nº 104 puede ser ácido glutámico o ácido aspártico, y (b) CDR1 (aa nº 24 a nº 34), CDR2 (aa nº 50 a nº 56) y CDR3 (aa nº 89 a nº 97) de SEC ID nº 2.

55 La numeración y definición de CDR sigue Kabat E. (ver, por ejemplo, Johnson G. *et al.*, Nucl. Acids Res. 28:214-218, 2000).

60 Preferentemente, el ácido nucleico codifica un polipéptido que es una cadena pesada que consiste de una región variable (VH) de SEC ID nº 1, en la que el aminoácido (aa) 30 indica serina o arginina, aa 31 indica asparagina o serina, aa 94 indica histidina o tirosina y aa 104 indica ácido aspártico o ácido glutámico, y de una región constante de cadena pesada (CH) humana, y una cadena ligera que consiste de una región variable (VL) de SEC ID nº 2, en la que aa nº 96 indica prolina o isoleucina, aa nº 100 indica prolina o glutamina, aa nº 103 indica arginina o lisina, aa nº

- 104 indica valina o leucina y aa n° 105 indica ácido aspártico o ácido glutámico, y de una región constante de cadena ligera (CL) humana.
- 5 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-IR humano (EC 2.7.1.112, SwissProt n° P08069) en competición con los anticuerpos caracterizados por las cadenas variables de SEC ID n° 1 a 6.
- 10 El anticuerpo se caracteriza adicionalmente por una afinidad de  $10^{-8}$  M ( $K_D$ ) o inferior, preferentemente de entre aproximadamente  $10^{-8}$  y  $10^{-11}$  M.
- Preferentemente, la invención proporciona anticuerpos que comprenden como regiones determinantes de complementariedad (CDRs) las secuencias siguientes:
- 15 - una cadena pesada de anticuerpo que comprende como CDRs, CDR1 (aa 31 a 35), CDR2 (aa 50 a 66) y CDR3 (aa 98 a 108) de SEC ID n° 1, en la que el aminoácido n° 31 puede ser asparagina o serina, el aminoácido n° 66 puede ser glicina o haber sido delecionado, y el aminoácido n° 104 puede ser ácido glutámico o ácido aspártico,
- una cadena ligera de anticuerpo que comprende como CDRs, CDR1 (aa n° 18 a n° 34 ó aa n° 24 a n° 34), CDR2 (aa n° 50 a n° 56) y CDR3 (aa n° 89 a n° 98) de SEC ID n° 2, en la que el aminoácido n° 96 puede ser prolina o isoleucina, y el aminoácido n° 98 puede ser fenilalanina o haber sido delecionado.
- 20 Por lo tanto, la invención también comprende un polipéptido y un ácido nucleico codificante seleccionado de entre el grupo anteriormente indicado, que consiste de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada, y de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de un anticuerpo IGF-IR según la invención.
- 25 Preferentemente, la invención comprende un anticuerpo caracterizado por una cadena pesada que consiste de una región variable (VH) de SEC ID n° 1, en la que el aminoácido (aa) 30 indica serina o arginina, el aa 31 indica asparagina o serina, el aa 94 indica histidina o tirosina y el aa 104 indica ácido aspártico o ácido glutámico, y de una región constante de cadena pesada (CH) humana,
- 30 y una cadena ligera que consiste de una región variable (VL) de SEC ID n° 2, en la que el aa n° 96 indica prolina o isoleucina, el aa n° 100 indica prolina o glutamina, el aa n° 103 indica arginina o lisina, el aa n° 104 indica valina o leucina y el aa n° 105 indica ácido aspártico o ácido glutámico, y de una región constante de cadena ligera (CL) humana.
- 35 Las regiones constantes permiten la unión del complemento C1q y, por lo tanto, preferentemente son del tipo IgG1 humano.
- Las combinaciones  
aa 30 Arg, aa 31 Asn, aa 94 Tyr y aa 104 Asp (anticuerpo 1A) o del aa 30 Arg, aa 31 Ser, aa 94 Tyr y aa 104 Asp (anticuerpo 8) o del aa 30 Ser, aa 31 Asn, aa 94 His y aa 104 Glu (anticuerpo 23 en la cadena pesada resultan preferentes.
- 40 Las combinaciones  
aa 96 Pro, aa 100 Pro, aa 103 Lys, aa 104 Val y aa 105 Asp (anticuerpos 1A y 8), aa 96 Ile, aa 100 Gln, aa 103 Arg, aa 104 Leu y aa 105 Glu (anticuerpo 23) en la cadena ligera resultan especialmente preferentes.
- 45 La combinación aa 30 Arg, aa 31 Asn, aa 94 Tyr y aa 104 Asp en la cadena pesada y de los aa 96 Pro, aa 100 Pro, aa 103 Lys, aa 104 Val y aa 105 Asp en la cadena ligera resultan especialmente preferentes.
- 50 El anticuerpo según la invención prolonga considerablemente el tiempo hasta la progresión en modelos relevantes de xenoinjerto tumoral en comparación con los animales tratados con vehículo y reduce el crecimiento tumoral. El anticuerpo inhibe la unión de IGF-I e IGF-II a IGF-IR in vitro e in vivo, preferentemente de una manera aproximadamente igual para IGF-I e IGF-II.
- 55 El anticuerpo se caracteriza además por la capacidad de unirse al receptor Fc de IgG y de inducir la ADCC y preferentemente de unirse al componente C1q del complemento e inducir la CDC.
- La invención proporciona además líneas celulares de hibridoma que producen dichos anticuerpos monoclonales antagonistas según la invención.
- 60 Las líneas celulares de hibridoma preferentes según la invención, el clon 1a de HuMAb <IGF-1R> (anticuerpo 1A, Ab 1A ó Ak 1A), el clon 23 de HuMAb <IGF-1R> (anticuerpo 23) y el clon 8 de HuMAb <IGF-1R> (anticuerpo 8) han sido depositados en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Alemania:

Línea celular	Depósito nº	Fecha de depósito
Clon 1a de HUMAB <IGF-1R>	DSM nº ACC 2586	10.04.2003
Clon 23 de HUMAB <IGF-1R>	DSM nº ACC 2588	10.04.2003
Clon 8 de HITMAB <IGF-1R>	DSM nº ACC 2589	24.04.2003

Son realizaciones preferentes de la invención los anticuerpos obtenibles a partir de dichas líneas celulares.

5 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.

10 La invención proporciona además métodos para el tratamiento del cáncer, que comprenden la administración en un paciente que se ha diagnosticado que presenta cáncer (y que, por lo tanto, requiere una terapia antitumoral) de una cantidad efectiva de un anticuerpo antagonista contra IGF-1R según la invención. El anticuerpo puede administrarse solo, en una composición farmacéutica, o alternativamente en combinación con un tratamiento citotóxico, tal como radioterapia o un agente citotóxico o un profármaco del mismo.

15 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.

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

25 La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo en un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica puede incluirse en un artículo manufacturado o kit.

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.

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

35 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 se recupera dicho anticuerpo a partir de dicha célula. La invención comprende además el anticuerpo obtenible mediante dicho método recombinante.

#### Descripción detallada de la invención

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

45 La expresión "fragmentos de anticuerpo" comprende una parte de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la parte de unión a antígeno o la región variable del mismo. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen los diacuerpos, las moléculas de anticuerpo de una cadena, las inmunotoxinas y los anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Además, los fragmentos de anticuerpo comprenden polipéptidos de una cadena que presentan las características de una cadena VH, es decir, son capaces de ensamblarse con un dominio VL, o de un dominio VL de unión a IGF-1R, es decir, son capaces de ensamblarse conjuntamente con una cadena VH a un bolsillo de unión a antígeno funcional, y de esta manera proporcionan las propiedades de inhibición de la unión de IGF-I e IGF-II a IGF-IR.

55 Los "fragmentos de anticuerpo" también comprenden los fragmentos que per se no son capaces de proporcionar funciones efectoras (ADCC/CDC) pero que proporcionan esta función de una manera según la invención tras combinarse con uno o más dominios constantes de anticuerpo apropiados.

- Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza 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.
- La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable, es decir una región de unión, obtenido 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.
- La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que el 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. 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-61 (GenBank nº M99682) y la cadena ligera variable preferentemente se deriva de la secuencia de línea germinal L15 (GenBank nº K01323). 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 en las bases de datos referenciadas en el mismo, y resultan útiles con la condición de que se conserven las propiedades de inducción de la ADCC y preferentemente de la CDC según la invención.
- 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 NS0 ó 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 transfectedo 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, el término "unión" se refiere a un anticuerpo de unión a IGF-IR con una afinidad de entre aproximadamente  $10^{-11}$  y  $10^{-9}$  M ( $K_D$ ), preferentemente de entre aproximadamente  $10^{-11}$  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 participan directamente en la unión del anticuerpo a un antígeno, aunque sí participan en las funciones efectoras (ADCC, unión del complemento y CDC). Por lo tanto, el dominio constante de un anticuerpo según la invención preferentemente es del tipo IgG1 humano. Los dominios constantes humanos que presentan dichas características se describen en detalle 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 7 a nº 10. Otros dominios constantes útiles son los dominios constantes de

los anticuerpos obtenibles a partir de las líneas celulares de hibridoma depositados en el DSMZ para la presente invención. Los dominios constantes que resultan útiles en la invención proporcionan unión del complemento. La ADCC, y opcionalmente la CDC, son proporcionadas por la combinación de dominios variables y constantes.

5 La expresión "región variable" (región variable de una cadena ligera (VL), región variable de una 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 participa 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  $\beta$  y las CDRs pueden formar bucles que conectan la estructura de hojas  $\beta$ . 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 de unión a 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".

La expresión "unión a IGF-IR" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la unión del anticuerpo a IGF-IR 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-IR se mide mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). La unión implica una afinidad de unión ( $K_D$ ) de  $10^{-8}$  M o inferior, preferentemente de entre  $10^{-11}$  y  $10^{-8}$  M.

La unión a IGF-IR puede investigarse mediante un ensayo BIAcore (Farmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia). La afinidad de unión está definida por 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 preferentemente muestran una  $K_D$  de  $10^{-9}$  M o inferior.

La unión de IGF-I e IGF-II a IGF-IR también resulta inhibida por los anticuerpos según la invención. La inhibición se mide como  $IC_{50}$  en un ensayo para la unión de IGF-I/IGF-II a IGF-IR sobre las células tumorales. Dicho ensayo se describe en el Ejemplo 7. En dicho ensayo, se mide la cantidad de IGF-I ó IGF-II marcado radioactivamente o de fragmentos de unión a IGF-IR de los mismos unidos a IGF-IR proporcionados en la superficie de dichas células tumorales (por ejemplo HT29), aplicando o no concentraciones crecientes del anticuerpo. Los valores de  $IC_{50}$  de los anticuerpos según la invención para la unión de IGF-I e IGF-II a IGF-IR no son superiores a 10 nM y la proporción entre los valores de  $IC_{50}$  para la unión de IGF-I/IGF-II a IGF-IR es de entre aproximadamente 1:3 y 3:1.

La expresión "inhibición de la unión de IGF-I e IGF-II a IGF-IR" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la inhibición de la unión de IGF-I ó IGF-II marcado con  $^{125}I$  a IGF-IR presentado sobre la superficie de células tumorales HT29 (ATCC nº HTB-38) en un ensayo *in vitro*. La inhibición se refiere a un valor de  $IC_{50}$  de 10 nM o inferior.

La expresión "células que expresan IGF-IR" se refiere a células que sobreexpresan el receptor de IGF-I hasta un nivel mínimo aproximado de 20.000 receptores/célula. Dichas células son, por ejemplo, líneas celulares tumorales tales como NCI H322M o una línea celular (por ejemplo 3T3) que sobreexpresa IGF-IR tras la transfección con un vector de expresión para IGF-IR.

La expresión "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)" se refiere a la lisis de células tumorales humanas diana según la invención en presencia de células efectoras. La ADCC se mide preferentemente mediante el tratamiento de una preparación de células que expresan IGF-IR con un anticuerpo según la invención en presencia de células efectoras, tales como PBMCs recién aisladas o células efectoras purificadas a partir de capas leucocitarias, por ejemplo monocitos o células NK. Se presenta la ADCC 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. El ensayo preferentemente se lleva a cabo con células tumorales marcadas con  $^{51}Cr$  y la medición de  $^{51}Cr$  liberado específicamente. Entre los controles se incluyen la incubación de las células tumorales diana con células efectoras aunque sin el anticuerpo.

La expresión "citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)" se refiere a la lisis de células tumorales humanas

diana 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-IR 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 preferentemente se lleva a cabo con células tumorales marcadas con  $^{51}\text{Cr}$  y la medición del  $^{51}\text{Cr}$  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-I" se refiere a la inhibición de la fosforilación de IGF-IR mediada por IGF-I. Para este ensayo, se estimulan células que expresan IGF-IR, preferentemente células H322M, con IGF-I y se tratan con un anticuerpo según la invención (una concentración de anticuerpos de 10 nM o inferior ( $\text{IC}_{50}$ ) resulta útil). A continuación, se lleva a cabo una SDS-PAGE y se mide la fosforilación de IGF-I mediante análisis de transferencia western con un anticuerpo específico para la tirosina fosforilada. La inhibición completa de la transducción de señales se observa en el caso de no se presente visiblemente ninguna banda en el filtro Western referida a IGF-IR fosforilado.

Los anticuerpos según la invención muestran una unión al mismo epítipo de IGF-IR que el anticuerpo 1A ó resultan inhibidos en su unión a IGF-IR debido a impedimentos estéricos de la unión por parte del anticuerpo 1A. La inhibición de la unión puede detectarse mediante un ensayo SPR utilizando anticuerpo inmovilizado 1A e IGF-IR 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 1A. Dicho ensayo puede llevarse a cabo de la misma manera, mediante la utilización del anticuerpo 8 ó 23 como anticuerpo inmovilizado.

El término "epítipo" se refiere a un determinante proteico capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítopos habitualmente consisten de grupos de moléculas en superficie químicamente activos, tales como cadenas laterales de aminoácidos o sacáridos y habitualmente presentan características de la estructura tridimensional específicas, así como características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión de los primeros, pero no de los segundos, se pierde en presencia de solventes desnaturizantes.

Entre los anticuerpos según la invención se incluyen, además, anticuerpos que presentan "modificaciones de secuencia conservadoras", 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 y histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo ácido aspártico y ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína y triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina y metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo treonina, valina e isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo tirosina, fenilalanina, triptófano e histidina). De esta manera, un residuo aminoácido no esencial predicho en un anticuerpo anti-IGF-IR humano puede sustituirse preferentemente por otro residuo aminoácido de la misma familia de cadenas laterales.

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 de los parámetros de unión  $k_a$ ,  $k_d$  y  $K_D$ , la unión al mismo epítipo al que se unen los anticuerpos 1A, 8 y 23, los valores de  $\text{IC}_{50}$  de inhibición de la unión de IGF-I e IGF-II a IGF-IR sobre las células tumorales y los valores de  $\text{IC}_{50}$  para la inhibición de la fosforilación de IGF-IR tras la estimulación de IGF-I sobre las células tumorales. La inhibición de la fosforilación de IGF-IR conduce a la inhibición de la fosforilación de elementos posteriores, tales como PKB, la regulación negativa de IGF-IR en células tumorales y la influencia del crecimiento tridimensional de las células tumorales *in vitro*. Los anticuerpos además se caracterizan preferentemente por sus valores farmacocinéticos y farmacodinámicos y la reactividad cruzada con otras especies.

Los anticuerpos según la invención preferentemente inhiben la fosforilación de tirosinas de IGF-IR.

Los anticuerpos según la invención preferentemente regulan negativamente el nivel de proteínas IGF-IR en las células 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-IR (por ejemplo

las células 3T3 NIH).

5 Los anticuerpos según la invención preferentemente muestran reactividad cruzada con IGF-IR de títi común (*Callithrix jacchus*) y de mono Cynomolgus (*Macaca fascicularis*), aunque no con IGF-IR de rata y de ratón. Tras dos semanas de tratamiento de primates *Macaca fascicularis* sanos, no pudieron detectarse indicios de efectos secundarios (200 mg/kg/semana).

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

Los anticuerpos según la invención preferentemente muestran vidas medias en suero de aproximadamente 10 a 18 días in vivo (en ratones desnudos, tales como ratones NMRI).

15 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 células huésped procarióticas o eucarióticas apropiadas, tales como células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, levaduras o células de *E. coli*, y el anticuerpo se recupera de las células (del sobrenadante o de las células tras la lisis).

20 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.

30 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 la 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, la formación de bandas en CsCl, la cromatografía de columna, la 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).

35 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.

40 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.

45 Un ácido nucleico se encuentra "operablemente ligado" en el caso de que se sitúe en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. 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 líinker según la práctica convencional.

50 Los anticuerpos monoclonales se separan convenientemente del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A-sefarosa, cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. El ADN y ARN codificante de los anticuerpos monoclonales se aísla y 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 transfieren 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.

- Las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo de IGF-IR humano se preparan 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 epítopos, pero pueden mejorar el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad de la proteína o facilitar la purificación.
- También puede sustituirse cualquier residuo cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación correcta del anticuerpo anti-IGF-IR, 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-IR 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 oligonucleótidos (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-IR humanizado.
- La invención también se refiere a inmunocombinados 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 misma), un isótopo radioactivo (es decir, un conjugado radioactivo) o un fármaco de un agente citotóxico. Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden utilizarse se incluyen la cadena A diftérica, los 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, proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas diantina, las proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAPS), inhibidor de *Nomordica 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 del anticuerpo y agente citotóxico se preparan mediante la utilización de una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, 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-diazonio-benzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). 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-metildietilentríaminapentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación de nucleótidos radioactivos al anticuerpo. Ver la patente WO n° 94/11026.
- Otro tipo de modificación covalente implica acoplar química o enzimáticamente glucósidos al 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 ligada a N o a O. 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 las cisteínas, (d) grupos hidroxilo libres, tales como las de la serina, la treonina o la hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos, tales como los de la fenilalanina, tirosina o triptófano, o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos se describe 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 cualesquiera fracciones de carbohidrato presentes en el anticuerpo puede llevarse a cabo por métodos químicos o enzimáticos. 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 todos los sacáridos excepto el sacárido de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando intacto el anticuerpo. Se describe la desglucosilación química 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 las fracciones de carbohidrato en los anticuerpos puede llevarse a cabo mediante la utilización de una diversidad de endoglucosidasas y exoglucosidasas, tal como describen 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 células B aisladas a partir de un animal no humano transgénico, por ejemplo un ratón transgénico, que expresa los anticuerpos anti-IGF-IR humanos según la invención. Preferentemente las células B aisladas se obtienen a partir de un animal no humano transgénico, por ejemplo un ratón transgénico, que ha sido inmunizado con una preparación purificada o enriquecida de antígeno IGF-IR y/o células que expresan IGF-IR. 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 codificantes de la totalidad o una parte de un anticuerpo de la invención. A continuación, las células B aisladas se immortalizan, proporcionando una fuente (por ejemplo un hibridoma) de anticuerpos anti-IGF-IR 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, fusionada 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 codificantes de la totalidad o una parte de un anticuerpo de la invención. El animal no humano transgénico puede inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida de antígeno IGF-IR y/o células que expresan IGF-IR. Preferentemente, el animal no humano transgénico, por ejemplo el ratón transgénico, es capaz de producir isotipos de IgG1 de anticuerpos monoclonales humanos de IGF-IR.

Los anticuerpos monoclonales humanos según la invención pueden producirse mediante 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 codificantes de la totalidad o una parte de un anticuerpo de la invención, con una preparación purificada o enriquecida de antígeno IGF-IR y/o células que expresan IGF-IR. A continuación se obtienen células B (por ejemplo células B esplénicas) del animal y se fusionan con células de mieloma con el fin de formar células de hibridoma inmortales que secretan anticuerpos monoclonales humanas contra IGF-IR.

En una realización preferente, pueden generarse anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra IGF-IR utilizando ratones transgénicos que portan partes del sistema inmunológico humano en lugar del sistema del ratón. Estos ratones transgénicos, denominados en la presente memoria ratones "HuMab", contienen miniloci de inmunoglobulina humana que codifican genes de inmunoglobulina humana no reorganizados que incluyen las cadenas pesadas ( $\mu$  e  $\gamma$ ) y la cadena ligera  $\kappa$  (genes de región constante) conjuntamente con mutaciones diana que inactivan los loci endógenos de las cadenas  $\mu$  y  $\kappa$  (Lonberg N. *et al.*, Nature 368:856-859, 1994). Por consiguiente, los ratones muestran una expresión reducida de IgM  $\alpha$  de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes introducidos de cadenas pesadas y ligera humanas experimentan cambios de clase y mutación somática, generando anticuerpos monoclonales IgG humanos de elevada afinidad (Lonberg N. *et al.*, Nature 368:856-859, 1994, revisión en Lonberg N., Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101, 1994; 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, el contenido de las cuales se incorporan como referencia en su totalidad en la presente memoria. Ver, además, las patentes US nº 5.545.806, nº 5.569.825, nº 5.625.126, nº 5.633.425, nº 5.789.650, nº 5.877.397, nº 5.661.016, nº 5.814.318, nº 5.874.299, nº 5.545.807, nº 5.770.429, y patentes WO nº 98/24884, nº 94/25585, nº 93/1227, nº 92/22645 y nº 92/03918.

Con el fin de generar anticuerpos monoclonales totalmente humanos de IGF-IR, pueden inmunizarse ratones HuMab con una preparación purificada o enriquecida de antígeno IGF-IR y/o células que expresan IGF-IR siguiendo el método general, tal como se describe en Lonberg N. *et al.*, Nature 368:856-859, 1994; Fishwild D.M. *et al.*, Nat. Biotechnol. 14:845-851, 1996, y en la patente WO nº 98/24884. Preferentemente, los ratones son de 6 a 16 semanas

de edad en la primera inmunización. Por ejemplo, puede utilizarse una preparación purificada o enriquecida de antígeno IGF-IR soluble (por ejemplo purificado a partir de células que expresan IGF-IR) para inmunizar los ratones HuMab por vía intraperitoneal. En el caso de que las inmunizaciones con una preparación purificada o enriquecida de antígeno IGF-IR no resulten en anticuerpos, los ratones también pueden inmunizarse con células que expresan IGF-IR, por ejemplo una línea celular tumoral, con el fin de estimular respuestas inmunológicas. La experiencia acumulada con diversos antígenos ha demostrado que los ratones transgénicos HuMab responden mejor en el caso de que se inmunicen inicialmente por vía intraperitoneal (i.p.) con el antígeno en adyuvante completo de Freund, seguido de inmunizaciones i.p. quincenales (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, extrayendo muestras de plasma mediante sangrados retroorbitales. Puede cribarse el plasma mediante ELISA, y los ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-IGF-IR pueden utilizarse para la inmortalización de las células B correspondientes. Los ratones puede recibir un refuerzo intravenoso de antígeno 3 a 4 días antes del sacrificio y la extirpación de bazo y nódulos linfáticos. Se espera que resulten necesarias 2 a 3 fusiones para cada antígeno. Se inmunizan varios ratones para cada antígeno. Por ejemplo, puede inmunizarse un total de doce ratones HuMab de las cepas HCo7 y HCo12.

Los ratones HCo7 presentan una interrupción de 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 interrupción de 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 interrupción de 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 interrupción de 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 HCo12 (tal como se describe en el Ejemplo 2 de la patente WO n° 01/14424).

Los linfocitos de ratón pueden aislarse y fusionarse con una línea celular de mieloma de ratón utilizando PEG basándose en protocolos estándares para generar hibridomas. A continuación, los hibridomas resultantes se criban para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, se fusionan suspensiones de células individuales de linfocitos derivados de bazo y nódulo linfático procedentes de ratones inmunizados, con un sexto del número de células de mieloma de ratón no secretoras SP 2/0 (ATCC n° CRL 1581) con PEG al 50%. Las células se siembran a razón de aproximadamente  $2 \times 10^5$  en una placa de microtitulación de fondo plano, seguido de una incubación de aproximadamente dos semanas en medio selectivo.

A continuación, se criban pocillos individuales mediante ELISA para anticuerpos monoclonales IgM e IgG humanos anti-IGF-IR. Tras producirse un crecimiento extensivo del hibridoma, se analiza el medio, habitualmente tras 10 a 14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpos se siembran en placa nuevamente, se criban nuevamente y, en caso de que todavía sean positivos para anticuerpos monoclonales IgG humanos anti-IGF-IR, pueden subclonarse por lo menos dos veces mediante dilución limitante. A continuación, los subclones estables se cultivan *in vitro* para producir anticuerpos en medio de cultivo de tejidos, para la caracterización.

Debido a que las secuencias de la CDR son responsables de las interacciones de anticuerpo-antígeno, resulta posible expresar anticuerpos recombinantes según la invención mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen las secuencias de CDR según la invención en secuencias de marco procedentes de un anticuerpo humano diferente (ver, por ejemplo, Riechmann L. *et al.*, Nature 332:323-327, 1998; Jones P. *et al.*, Nature 321:522-525, 1986, y Queen C. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033, 1989). Dichas secuencias de marco pueden obtenerse de bases de datos de ADN públicas que incluyan secuencias génicas de anticuerpos de la línea germinal humana. Estas secuencias de línea germinal serán diferentes de las secuencias génicas de los anticuerpos maduros debido a que no incluirán genes variables completamente ensamblados, los cuales se forman mediante unión V(D)J durante la maduración de las células B. Las secuencias génicas de línea germinal también serán diferentes de las secuencias de un anticuerpo de alta afinidad de un segundo repertorio en sitios individuales a lo largo de la región variable.

La invención preferentemente comprende un fragmento de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido de unión a IGF-IR, en el que dicho polipéptido inhibe la unión de IGF-I e IGF-II a IGF-IR, seleccionado de entre el grupo que consiste de:

una cadena pesada que consiste de una región variable (VH) de SEC ID n° 1, en la que el aminoácido (aa) 30 indica serina o arginina, el aa 31 indica asparagina o serina, el aa 94 indica histidina o tirosina y el aa 104 indica ácido aspártico o ácido glutámico, y de una región constante de cadena pesada (CH) humana o un fragmento de la misma, y una cadena ligera que consiste de una región variable (VL) de SEC ID n° 2, en la que el aa n° 96 indica prolina o isoleucina, el aa n° 100 indica prolina o glutamina, el aa n° 103 indica arginina o lisina, el aa n° 104 indica valina o leucina y el aa n° 105 indica ácido aspártico o ácido glutámico, y de una región constante de cadena ligera (CL)

humana o un fragmento de la misma.

Son fragmentos de ácidos nucleicos particularmente preferentes según la invención los fragmentos de ácidos nucleicos codificantes de un polipéptido según la invención que comprenden como regiones de CDR

una cadena pesada de anticuerpo que comprende como CDRs, CDR1 (aminoácidos 31 a 52), CDR2 (aminoácidos 50 a 66) y CDR3 (aminoácidos 98 a 108) de secuencia SEC ID nº 1, en la que el aminoácido 31 puede ser asparagina o serina, el aminoácido 66 puede ser glicina o haber sido deletado, y el aminoácido 104 puede ser ácido glutámico o ácido aspártico; una cadena ligera de anticuerpo que comprende como CDRs, CDR1 (aminoácidos 18 a 34 ó aminoácidos 24 a 34), CDR2 (aminoácidos 50 a 56) y CDR3 (aminoácidos 89 a 98) de secuencia SEC ID nº 2, en la que el aminoácido 96 puede ser prolina o isoleucina, y el aminoácido 98 puede ser fenilalanina o haber sido deletado.

Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera reconstruidos se combinan con secuencias de promotor, de inicio de traducción, de región constante, de 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.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la invención proporciona un método para la producción de un anticuerpo humano recombinante según la invención, caracterizado porque expresa un ácido nucleico codificante de una cadena pesada que consiste de una región variable (VH) de secuencia SEC ID nº 1, en la que el aminoácido (aa) 30 indica serina o arginina, el aminoácido 31 indica asparagina o serina, el aminoácido 94 indica histidina o tirosina y el aminoácido 104 indica ácido aspártico o ácido glutámico, y de una región constante de cadena pesada (CH) humana, y una cadena ligera que consiste de una región variable (VL) de secuencia SEC ID nº 2, en la que el aminoácido 96 indica prolina o isoleucina, el aminoácido 100 indica prolina o glutamina, el aminoácido 103 indica arginina o lisina, el aminoácido 104 indica valina o leucina y el aminoácido 105 indica ácido aspártico o ácido glutámico, y de una región constante de cadena ligera (CL) humana en una célula huésped procariótica o eucariótica y recuperar dicho anticuerpo a partir de dicha célula. Las regiones constantes permiten la unión del complemento C1q y, por lo tanto, preferentemente son del tipo IgG1 humano. Preferentemente, la región variable de cadena pesada contiene la combinación de aminoácidos de aminoácido 30 Arg, aminoácido 31 Asn, aminoácido 94 Tyr y aminoácido 104 Asp o aminoácido 30 Arg, aminoácido 31 Ser, aminoácido 94 Tyr y aminoácido 104 Asp o aminoácido 30 Ser, aminoácido 31 Asn, aminoácido 94 His y aminoácido 104 Glu.

Preferentemente, la región variable de cadena ligera contiene la combinación de aminoácidos de aminoácido 96 Pro, aminoácido 100 Pro, aminoácido 103 Lys, aminoácido 104 Val y aminoácido 105 Asp (anticuerpos 1A y 8), aminoácido 96 Ile, aminoácido 100 Gln, aminoácido 103 Arg, aminoácido 104 Leu y aminoácido 105 Glu (anticuerpo 23).

La combinación aminoácido 30 Arg, aminoácido 31 Asn, aminoácido 94 Tyr y aminoácido 104 Asp en la cadena pesada y de aminoácido 96 Pro, aminoácido 100 Pro, aminoácido 103 Lys, aminoácido 104 Val y aminoácido 105 Asp en la cadena ligera resultan especialmente preferentes.

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

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo una composición farmacéutica, que contiene un anticuerpo monoclonal o una combinación de anticuerpos monoclonales, o la porción de unión a antígeno de los mismos, de la presente invención, formulados conjuntamente con un portador farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, en combinación 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.

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, citoxina, taxol, metotrexato, cisplatino, melfalán, vinblastina, bleomicina, etopósido, ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, carboplatino, tenipósido, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, esperamicinas (ver la patente US nº 4.675.187), melfalán y otras mostazas nitrogenadas relacionadas.

La expresión "agente citotóxico" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una sustancia que inhibe o impide el funcionamiento de las células y/o provoca la destrucción de las células. 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.

5 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 es menor citotóxica para las células tumorales en comparación con el fármaco parental y es capaz de resultar activada o convertida enzimáticamente en la forma parental, más activa. Ver, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", Biochemical Society Transactions 14: 375-381, 615th Meeting Belfast (1986), y Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", Directed Drug Delivery, Borchardt *et al.* (editor), páginas 247 a 267, Humana Press, 1985. Entre los profármacos de la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, profármacos fosfatados, profármacos tiosfosfatados, profármacos sulfatados, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados por D-aminoácidos, profármacos glucosilados, profármacos con anillos  $\beta$ -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 más activo no citotóxico. Entre los ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivatizarse en una forma profármaco para la utilización en la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los agentes quimioterapéuticos indicados anteriormente.

20 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).

25 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 las sales de adición de ácido y las sales de adición de base. Entre las sales de adición de ácido se incluyen aquéllas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como las sales hidroclicóricas.

30 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 variarán dependiendo de los resultados deseados. 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.

40 Entre los portadores farmacéuticos 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.

45 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, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal

50 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.

60 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.

65 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 en un paciente, composición y modo de administración particulares, sin resultar tóxicos 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, o el éster, sal o amida de las mismas, la vía de administración, el momento de la administración, la tasa de excreción del compuesto particular utilizado, otros fármacos, los compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares utilizadas, la edad, el sexo, el peso, la condición, el estado general de salud y la historia médica anterior del paciente bajo tratamiento, y factores similares bien conocidos de las técnicas médicas.

La composición debe ser estéril y líquida en grado suficiente para que la composición resulte administrable mediante jeringa. Además de agua, el portador puede ser una solución salina tamponada isotónica, etanol, poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos.

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. La absorción a largo plazo de las composiciones inyectables puede llevarse a cabo mediante la inclusión en la composición de un agente que retarde la absorción, por ejemplo el monoestearato de aluminio o la gelatina.

En el caso de que el compuesto activo se proteja convenientemente, tal como se ha indicado anteriormente, el compuesto puede administrarse por vía oral, por ejemplo con un diluyente inerte o un portador comestible asimilable.

Los anticuerpos según la invención pueden utilizarse para el tratamiento de un paciente que sufre una enfermedad tumoral y que requiere una terapia antitumoral. Por lo tanto, la invención comprende un método para el tratamiento de un paciente tumoral, preferentemente un paciente que sufre de cáncer, especialmente de cáncer de colon, mama, próstata o pulmón.

La invención proporciona además un método para la preparación de una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un anticuerpo según la invención conjuntamente con un portador farmacéuticamente aceptable y la utilización del anticuerpo según la invención para dicho método.

La invención proporciona además el método de tratamiento, el método de preparación y la composición farmacéutica de un anticuerpo según la invención conjuntamente con un agente quimioterapéutico, preferentemente citotóxico, o un profármaco del mismo.

Además, los anticuerpos pueden utilizarse en combinación con una radioterapia citotóxica.

Los ejemplos, referencias, listado de secuencias y figuras siguientes se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas. Debe entenderse que resulta posible llevar a cabo modificaciones de los procedimientos indicados sin apartarse del espíritu de la invención.

#### Descripción de las figuras

Figura 1 Expresión superficial de IGF-IR en cultivo celular de baja y alta densidad.

Figura 2 Ensayo de WST para la inhibición de la proliferación en cultivo 3D.

Figura 3 Volumen de tumor primario medido durante el tratamiento hasta el día 55; vehículo: 1; anticuerpo 1A 20 mg/kg: 2; anticuerpo 1A 7 mg/kg: 3; anticuerpo 1A 2 mg/kg: 4.

Figura 4 Inhibición de la unión de IGF-I-<sup>125</sup>I a células HT29 por parte de los anticuerpos 1A, 8 y 23.

Figura 5 Inhibición de la unión de IGF-I-<sup>125</sup>I a diversas líneas celulares tumorales humanas por parte de anticuerpos contra hIGF-IR.

Figura 6 Inhibición de la unión de IGF-I-<sup>125</sup>I a células HT29 por parte del anticuerpo 1A.

Figura 7 Inhibición de la unión de IGF-I-<sup>125</sup>I a células HT29 por parte del anticuerpo  $\alpha$ IR3.

Figura 8 Bloqueo de la fosforilación inducida por IGF-I de tanto IGF-IR como AKT/PKB.

Figura 9 Regulación negativa del nivel de proteína IGF-IR sobre las células tumorales.

Figura 10 Falta de inhibición de la unión de insulina-<sup>125</sup>I a las células 3T3-IR por parte de los anticuerpos anti-hIGF-1R (MAX sin Ab: unión máxima de insulina-<sup>125</sup>I; MIN: unión mínima tras la competición con insulina 1 mM)

Figura 11 Inducción de la regulación negativa de IGF-IR *in vivo*.

Figura 12 Reactividad cruzada de los anticuerpos con IGF-IR de otras especies.

## 5 Ejemplo 1

Generación de una línea celular de hibridoma productora de anticuerpos anti-IGF-IR

Cultivo de hibridomas

10 Los hibridomas HuMab generados se cultivaron en medio Hybridoma Express (PAA Laboratories GmbH, Austria) suplementado con L-glutamina 2 mM (BioWhittaker) y factor de clonación Origen al 4% (Igen, Francia) a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub>, o en medio de Dulbecco modificado por Iscove (500 ml: BioWhittaker Europe, Bélgica) suplementado con suero Fetal Clone (50 ml: Hyclone, Utah) y factor de clonación de hibridoma Origen (30 ml: Igen, Gaithersburg, MD) a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub>.

Procedimiento de inmunización de los ratones transgénicos

20 Se inmunizaron diez ratones transgénicos HCo7 (4 machos y 6 hembras), cepa GG2201 (Medarex, San José, CA, USA) alternativamente con 1x10<sup>6</sup> células 3T3 NIH, se transfectaron con un vector de expresión para IGF-IR y 20 mg de dominio extracelular soluble de IGF-IR. Se llevaron a cabo seis inmunizaciones en total, tres inmunizaciones intraperitoneales (IP) con las células que expresaban IGF-IR y tres inmunizaciones subcutáneas (SC) en la base de la cola con la proteína recombinante. Para la primera inmunización, se mezclaron 100 ml de 1x10<sup>6</sup> células 3T3 NIH IGF-IR con 100 ml de adyuvante completo de Freund (CFA, Difco Laboratories, Detroit, USA). Para todas las demás inmunizaciones, se utilizaron 100 ml de células en PBS o se mezcló la proteína recombinante con 100 ml de adyuvante incompleto de Freund (ICFA, Difco).

ELISA específica de antígeno

30 Se determinaron los títulos de anti-IGF-IR en sueros de ratones inmunizados mediante ELISA específica de antígeno. Se recubrieron placas de 96 pocillos con dominio extracelular soluble de IGF-IR a una concentración de 1 mg/ml en PBS, durante la noche a 4°C o durante dos horas a 37°C. A continuación, los pocillos se bloquearon con PBSTC (PBS suplementado con Tween<sup>®</sup>-20 al 0,05% y suero de pollo al 2% (Gibco BRL)) durante 1 hora (h) a temperatura ambiente. Los sueros de la primera recolección se diluyeron 1/50 en PBSTC, los sueros de las demás recolecciones se prediluyeron 1/100 en PBSTC y se diluyeron en serie hasta 1/6.400. Los sueros diluidos se añadieron a los pocillos y se incubaron durante 1 hora a 37°C. El suero previo a la recolección se utilizó como control negativo. Se utilizó anticuerpo de cabra (200 ng/ml) anti-IGF-IR humano (100 mg/ml) a modo de control positivo. A continuación, se lavaron dos veces las placas con PBST y se incubaron con F(ab')<sub>2</sub> de rata anti-IgG humano conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (DAKO), se diluyeron 1/2.000 en PBSTC durante 1 hora a 37°C. Los pocillos se lavaron dos veces con PBST y los ensayos se revelaron con solución ABTS<sup>®</sup> recién preparada (1 mg/ml) (ABTS: 2,2'-azino bis(ácido 3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico) durante 30 minutos a temperatura ambiente (RT) en la oscuridad. Se leyó la absorbancia a 405 nm.

Análisis FACS

45 Además de la determinación mediante ELISA específica de antígeno, también se determinaron títulos anti-IGF-IR en sueros de ratones inmunizados mediante análisis FACS. Se incubaron células 3T3 NIH IGF-IR y las células 3T3 NIH parentales con sueros diluidos durante 30 minutos a 4°C. Se llevaron a cabo inmunizaciones alternativamente IP y SC a intervalos de dos semanas comenzando con una inmunización IP. Se utilizó el suero previo a la recolección (células 3T3 NIH parentales) a modo de control negativo. Inicialmente se utilizó anticuerpo de cabra (200 ng/ml) anti-IGF-IR humano a modo de control positivo. Las células se lavaron tres veces en PBS suplementado con albúmina de suero bovino al 1% y azida al 0,01%. A continuación, las células se incubaron con fragmentos de unión a antígeno conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (fragmentos F(ab')<sub>2</sub>) de anticuerpo de rata anti-IgG humana diluido 1/100 en tampón FACS durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron dos veces en tampón FACS y las muestras se analizaron en un FACSCalibur (Becton Dickinson, Erembodegem-Aalst, Bélgica).

Inmunizaciones de refuerzo de los ratones

55 En el caso de que los títulos séricos de anti-IGF-IR fuesen suficientes, los ratones recibieron adicionalmente dos refuerzos de 15 mg de dominio extracelular de IGF-IR en 200 ml de PBS por vía intravenosa (i.v.) 4 y 3 días antes de la fusión.

Generación de hibridomas

60 Se sacrificaron los ratones y se recolectaron bazo y nódulos linfáticos flanqueantes de la aorta abdominal y la vena cava. La fusión de esplenócitos y células de nódulo linfático con las células de pareja de fusión SP 2.0 se llevó a cabo siguiendo procedimientos operativos estándares.

κ-ELISA

65 Con el fin de determinar si los hibridomas resultantes de la fusión generan 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) diluida 1/10.000 en PBS mediante incubación durante la noche a 4°C. Tras descartar los pocillos, las placas se bloquearon mediante 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 medio de cultivo diluido 1/2 en PBSTC a modo de control negativo y suero de ratón positivo para cadena ligera diluido 1/100 en PBSTC sirvió de control positivo. A continuación, los pocillos se lavaron tres veces y se incubaron con F(ab')<sub>2</sub> de rata anti-IgG humana conjugado con HRP (DAKO), diluido 1/2.000 en PBSTC durante 1 hora a 37°C. Los pocillos se lavaron tres veces y los ensayos se revelaron con solución ABTS<sup>®</sup> recién preparada (1 mg/ml) durante 30 minutos a temperatura ambiente (RT) en la oscuridad. Se leyó la absorbancia a 405 nm en un lector de placas de ELISA.

Se prepararon tres anticuerpos monoclonales.  
 Anticuerpo 1A: SEC ID n° 1 y n° 2 Anticuerpo 8: SEC ID n° 3 y n° 4 Anticuerpo 23: SEC ID n° 5 y n° 6.

### Ejemplo 2

Determinación de la afinidad de los anticuerpos anti-IGF-IR para IGF-IR

Instrumento: BIACORE<sup>®</sup> 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 humanos (de conejo) a la superficie de un chip para la presentación del anticuerpo a IGF-IR. Se añadió dominio extracelular de IGF-IR a diversas concentraciones en solución. Se midió la asociación mediante una inyección de IGF-IR durante 3 minutos; se midió la disociación mediante lavado de la superficie del chip con tampón durante 5 minutos. Se muestran los datos de afinidad para los anticuerpos 1A, 8 y 23 en la Tabla 1.

Tabla 1:

Datos de afinidad medidos mediante SPR (BIACORE <sup>®</sup> 3000)				
Anticuerpo	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KA (1/M)	KD (M)
1A	1,18x10 <sup>5</sup>	4,68x10 <sup>-5</sup>	2,52x10 <sup>9</sup>	3,97x10 <sup>-10</sup>
8	8,18x10 <sup>4</sup>	1,61x10 <sup>-4</sup>	4,98x10 <sup>8</sup>	2,01x10 <sup>-9</sup>
23	8,41x10 <sup>4</sup>	1,63x10 <sup>-5</sup>	5,17x10 <sup>9</sup>	1,94x10 <sup>-10</sup>

### Ejemplo 3

Ensayo WST de proliferación

Con el fin de evaluar la capacidad de los anticuerpos de HuMab de inhibir la proliferación inducida por IGF-I de las líneas celulares que expresaban IGF-IR, se llevó a cabo un ensayo WST-1 de proliferación. La línea celular 3T3 NIH que expresaba IGF-IR se cultivó durante dos días en medio de ayuno (es decir, medio de cultivo normal con FCS al 0,5% en lugar de FCS al 10%); 9x10<sup>3</sup> células en cada pocillo en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos con el fin de devolver el sistema metabólico a un nivel basal. A continuación, se retiró el medio y se llenaron los pocillos con 100 µl de medio de ayuno que contenía los compuestos siguientes: 1) IGF-I 10<sup>-9</sup> M; 2) IGF-I 10<sup>-9</sup> M más 10 mg/ml de anticuerpo de HuMab purificado en proteína A; 3) IGF-I 10<sup>-9</sup> M más 10 mg/ml de IIR3. A modo de controles negativos se incubaron células con medio de ayuno; a modo de control positivo se incubaron células con sólo medio de cultivo. Las células se cultivaron durante dos días adicionales. A continuación, se añadieron 10 µl de reactivo WST-1 (Roche Diagnostics GmbH) a los pocillos para detectar las células vivas. Tras 2 a 3 horas, se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de ELISA. Se calculó el porcentaje de inhibición de la proliferación según la fórmula siguiente:

$$DO_{100\% \text{ crecim.}} = DO_{IGF-I} - DO_{\text{medio de ayuno}}$$

$$\text{Inhibición de la proliferación: } (1 - DO_{\text{muestra}} / DO_{100\% \text{ crecim.}}) \times 100\%$$

### Ejemplo 4

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

**Materiales y métodos:**

Se cultivaron células H322M NCI en medio RPMI sobre cubreobjetos de vidrio de grado óptico, a baja densidad o superconfluentes, con el fin de estudiar los efectos sobre la expresión en superficie de IGF-IR. En paralelo, se congeló instantáneamente en isopentano tejido de xenoinjerto H322M aislado a partir del grupo de control (ratones no tratados) y se obtuvieron criosecciones de 5 µm de grosor. Se llevó a cabo el marcaje de inmunofluorescencia mediante la utilización de un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IGF-IR (αIR3, 5 mg/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. Se obtuvieron imágenes de los especímenes en un microscopio confocal Leica SP2 ó se analizaron mediante FACS.

**Resultados:**

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

También se cuantificó mediante FACS la regulación positiva del receptor superficial de IGF-I en cultivos superconfluentes de células H322M. La expresión en superficie del receptor de IGF-I se incrementó en más de 10 veces al cultivar las células bajo condiciones de alta densidad, comparado con condiciones de 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-I sobre la superficie celular tras establecerse los sitios de contacto célula-célula no es una característica única de las células H322M sino que aparentemente es una propiedad general más propia una organización similar a un tejido, que también se observa in vivo (fig. 1).

Inhibición del crecimiento de células tumorales H322M que expresan IGF-IR en cultivo 3D bajo tratamiento con anticuerpo 1A

**Materiales y métodos:**

Se cultivaron células H322M en medio RPMI1640/NCS al 10% sobre placas recubiertas con poli-HEMA (poli(2-hidroxietilmetacrilato)) para evitar la adherencia a la superficie plástica. Bajo estas condiciones las células H322M forman esferoides densos que crecen tridimensionalmente (una propiedad que se denomina "independencia de anclaje"). Estos esferoides representan la arquitectura histológica y organización tridimensionales de los tumores sólidos *in situ*. Los cultivos de esferoides se incubaron durante 9 días en presencia de cantidades crecientes de anticuerpos, de 0 a 10 mg/ml. Se utilizaron dos anticuerpos no específicos (anticuerpos contra VHB y contra E25) a modo de controles negativos. Se utilizó el ensayo de conversión de WST para medir la inhibición del crecimiento.

**Resultados:**

Al tratar los cultivos de esferoides de H322M con diferentes concentraciones de anticuerpo 1A (0,32 a 10 mg/ml), pudo observarse una inhibición del crecimiento dependiente de la dosis, mientras que los anticuerpos de control contra VHB y E25 (anti-IgE) presentar un efecto reducido o nulo. La reducción de WST en el caso del anticuerpo 1A se debe principalmente, por lo tanto, a una proliferación reducida de las células (fig. 2).

**Ejemplo 5****Determinación de las propiedades farmacocinéticas**

Se administró anticuerpo 1A en dos estudios farmacocinéticos diferentes. Para el primer estudio se administró anticuerpo formulado en solución tampón de fosfato potásico. Para el segundo estudio se administró anticuerpo formulado en solución de cloruro sódico/histidina.

**5a) Primer estudio animal**

Se utilizaron ratones NMRI hembra (peso corporal: 18 a 23 g). Se administró anticuerpo 1A en forma de solución (KPO<sub>4</sub> para las vías de administración i.v. e i.p.).

**Dosis:**

10 mg/kg i.v. Concentración de fármaco. 1 mg/ml. Volumen administrado: 10 ml/kg. 10 mg/kg i.p. Concentración de fármaco: 1 mg/ml. Volumen administrado: 10 ml/kg. Administración de una dosis única.

A continuación se analizaron muestras de plasma para los niveles plasmáticos del compuesto utilizando un método ELISA de IgG humana.

**Reactivos:**

Anticuerpos: Anticuerpo de captura: anticuerpo policlonal de conejo contra cadenas ligeras kappa de IgG humana (Dako, nº de código A0191).

Anticuerpo de detección: anticuerpo policlonal de conejo contra IgG humana, conjugado con peroxidasa de rábano picante (DAKO, nº de código P0214).

## ES 2 383 014 T3

Procedimiento de ensayo:

Recubrimiento de la placa de microtitulación:

Etapa

- 5 - dilución de anticuerpo de captura: 1:10.000 con carbonato-Na 100 mM, pH=9,6  
 - adición de 100 ml de dicha solución (etapa 1) a cada pocillo - incubación de la placa a 4°C durante la noche (12 h)  
 - eliminación de los solventes de cada pocillo - lavado 3 veces con 300 ml/pocillo de PBST

10 Adición a muestra animal y muestra de calibración, respectivamente muestra animal diluida (del intervalo de 1 a 10 hasta 1 a 200.000) y muestra de calibración, respectivamente (concentraciones: 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 y 40 ng/ml de IgG humana) de BSA al 3%/PBST:

- adición de 100 ml de muestra animal/de calibración a cada pocillo incubación durante 1 hora a temperatura ambiente (22°C) lavado 3 veces con 300 ml/pocillo de PBST

15 Detección:

- anticuerpo de detección diluido 1:2.000 con BSA al 3%/PBST  
 - adición de 100 ml a cada pocillo  
 - incubación durante 1 hora a temperatura ambiente (22°C)  
 20 - lavado 3 veces con 300 ml/pocillo de PBST - adición de 100 ml de solución ABTS® a cada pocillo  
 - tras aproximadamente 10 minutos, parada de la reacción de color utilizando 50 ml/pocillo de ácido oxálico 0,5 M  
 - medición de la extinción a 405 nm

25 Parámetros PK:

Tabla 2:

Parámetros farmacocinéticos del anticuerpo 1A formulado en tampón de fosfato potásico			
Parámetro	unidades		
Especie		Ratón	Ratón
Cepa		NMRI	NMRI
Sexo		hembra	hembra
Formulación		Tampón fosfato	Tampón fosfato
Dosis	mg/kg	10,0	10,0
Vía de administración		i.v.	i.p.
C <sub>MAX</sub>	ng/mL	208000	68800
C <sub>MAX_NORM</sub>	ng/ml / mg/kg	20800	6880
T <sub>MAX</sub>	h	0	96
AUC <sub>0_LST</sub>	h.ng/mL	36300000	32300000
AUC <sub>0_LST_NORM</sub>	h.ng/mL / mg/kg	3630000	3230000
AUC <sub>0_INF</sub>	h.ng/mL	40200000	36300000
AUC <sub>0_INP_NORM</sub>	h.ng/mL / mg/kg	4020000	3630000
PCT_AUC_EXTRA	%	9,75	11,00
MRT_LST	h	324	348
MRT_INF	h	437	475
CL_TOTAL	ml/min/kg	0,00414	
VZ	L/kg	0,11	
VSS	L/kg	0,1	
VIDAMEDIA_Z	h	308 (=12,8 días)	324 (=13,5 días)
F	%	100,0	89,0

## ES 2 383 014 T3

### 5b) Segundo estudio animal Animales:

Se utilizaron ratones NMRI hembra (peso corporal: 21 a 28 g). Se administró anticurepo 1A en forma de solución (histidina/cloruro sódico) para las vías de administración i.v. e i.p.

#### 5 Dosis:

10 mg/kg i.v. Concentración de fármaco:	1 mg/ml	Volumen administrado: 10 ml/kg
2 mg/kg i.p. Concentración de fármaco:	0,2 mg/ml	Volumen administrado: 10 ml/kg
20 mg/kg i.p. Concentración de fármaco:	2 mg/ml	Volumen administrado: 10 ml/kg

#### Administración de dosis única

10 A continuación se analizaron muestras de plasma para los niveles plasmáticos del compuesto utilizando un método ELISA de IgG humana. La calibración se realizó utilizando el anticuerpo 1A para la preparación de las muestras de calibración.

Reactivos y procedimiento de ensayo: ver el Ejemplo 5a

#### 15

#### Parámetros PK:

Tabla 3:

Parámetros farmacocinéticos del anticuerpo 1A formulado en solución de histidina/cloruro sódico				
Especie		Ratón	Ratón	Ratón
Cepa		NMRI	NMRI	NMRI
Sexo		hembra	hembra	hembra
Formulación		solución (NaCl/histidina)	solución (NaCl/histidina)	solución (NaCl/histidina)
Dosis	mg/kg	10	2	20
Vía de administración		i.v.	i.p.	i.p.
C <sub>MAX</sub>	ng/mL	222000	27900	186000
C <sub>MAX_NORM</sub>	ng/ml / mg/kg	22200	14000	9300
T <sub>MAX</sub>	h	0	24	24
AUC <sub>0_LST</sub>	h.ng/mL	30500000	4920000	59000000
AUC <sub>0_LST_NORM</sub>	h.ng/mL / mg/kg	3050000	2460000	2950000
AUC <sub>0_INF</sub>	h.ng/mL	36700000	6910000	72100000
AUC <sub>0_INF_NORM</sub>	h.ng/mL / mg/kg	3670000	3460000	3610000
PCT_AUC_EXTRA	%	16,90	28,80	18,20
MRT_LST	h	247	217	239
MRT_INF	h	381	513	389
CL_TOTAL	ml/min/kg	0,00454		
CL_TOTAL_CTG	L,M,H			
CL_ORAL	ml/min/kg		0,00482	0,00462
VZ	L/kg	0,102		
VZ_ORAL	(Vz/F) L/kg		0,166	0,108
VSS	L/kg	0,1		

VSS_CTG	L,M,H	L		
VIDAMEDIA_Z	h	260,0	399,0	270,0
F	%	100,0	80,7	96,7

Abreviaturas:

Significado de las abreviaturas

Abreviatura	Significado
C <sub>MAX</sub>	C <sub>max</sub>
C <sub>MAX_NORM</sub>	C <sub>max</sub> normalizado para la dosis
T <sub>MAX</sub>	T <sub>max</sub>
AUC <sub>0_INF</sub>	AUC extrapolada
AUC <sub>0_LST</sub>	AUC observada
AUC <sub>0_INF_NORM</sub>	AUC extrapolada, normalizada
AUC <sub>0_LST_NORM</sub>	AUC observada, normalizada
PCT_AUC_EXTRA	porcentaje de AUC extrapolada
CL <sub>TOTAL</sub>	Eliminación total
VSS VZ	Volumen de la distribución en equilibrio estable Volumen de la distribución terminal
MRT <sub>INF</sub>	Tiempo medio de residencia (extrapolado)
MRT <sub>LST</sub>	Tiempo medio de residencia (observado)
VIDAMEDIA_Z F	Vida media terminal Biodisponibilidad (i.v.≈100%)

5

### Ejemplo 6

Ensayos farmacodinámicos del anticuerpo 1A recombinante anti-IGF-IR

10 Se investigaron los efectos del anticuerpo *in vivo*. Se indujeron tumores en ratones desnudos atímicos siguiendo métodos establecidos. Se coinyectaron células H322M humanas conjuntamente con Matrigel por vía subcutánea en ratones desnudos atímicos de 6 a 7 semanas de edad (nu/nu). Con este fin, se concentraron  $5 \times 10^6$  células H322M en 100 ml de medio de cultivo y se mezclaron con 100 ml de Matrigel®. Se inyectaron 200 ml de dicha mezcla en los flancos derechos de los ratones. Se inició el tratamiento al alcanzar los tumores un volumen medio de 125 mg. Se calculó el volumen tumoral mediante la medición de los diámetros tumorales con calibradores de Vernier dos veces a la semana según la fórmula:

$$\text{volumen tumoral [mg]} = (\text{longitud} \times (\text{anchura})^2)$$

(Gallicchio, M.A., *et al.*, Int. J. Cancer 94:645-651, 2001).

20 Todos los anticuerpos se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) a razón de 10 ml/kg.

Tras crecer los tumores hasta un volumen medio de 100 mg, el anticuerpo se administró dos veces a la semana i.p. a razón de 20 mg/kg, 7 mg/kg y 2 mg/kg doce veces, iniciando el tratamiento con una dosis de carga doble proporcionada una vez el primer día del periodo de tratamiento. Las tres dosis del anticuerpo presentaron un efecto sobre el volumen del tumor primario. La figura 3 muestra el tamaño tumoral en relación a los diversos tratamientos en el tiempo. El experimento demuestra que el bloqueo del eje de IGF-IR por parte del anticuerpo 1A resulta en buenos efectos antitumorales.

### Ejemplo 7

30 Inhibición de la unión de IGF-I e IGF-II a células tumorales que expresan IGF-IR  
Con el fin de determinar la capacidad del anticuerpo de la invención de bloquear la unión de los ligandos IGF-I e IGF-II al receptor de IGF-I (IGF-IR), se llevaron a cabo experimentos de competición con ligandos péptidos marcados radioactivamente.

35 Se sembraron en placas células tumorales humanas (HT29, H322M NCI,  $0,5$  a  $1 \times 10^5$ /ml) en medio RPMI 1640 (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 calor al 10% (PAA, nº de cat. A15-771). En seis botellas del formato T175 se inocularon 20 ml de células en el medio respectivo para cada experimento y se cultivaron durante dos días a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub> con el fin de obtener monocapas celulares confluentes.

5 Para la recolección de células individuales, se añadieron 2 ml de 1x tripsina/EDTA (Gibco, nº de cat. 25300-054) a cada matraz T175 y se realizó un seguimiento del desprendimiento de las células utilizando un microscopio Zeiss Axiovert25. Se recogieron las células y se añadió medio con FCS al 10% tal como se ha descrito anteriormente a un volumen total de 50 ml. Las células se aislaron nuevamente 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, MgSO<sub>4</sub> 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 la densidad a 1x10<sup>6</sup> células/ml con tampón de unión.

15 Los péptidos IGF-I e IGF-II marcados con <sup>125</sup>I (Amersham, ~2.000 Ci/mmol, nº de cat. IM172 e IM238), solubilizados en CH<sub>3</sub>COOH al 0,1%, se diluyeron en tampón de unión hasta una actividad final de 4x10<sup>5</sup> pulsos/(minuto x ml). Se añadieron 75 ml de anticuerpo a las concentraciones indicadas conjuntamente con 25 ml de péptido IGF-I ó IGF-II marcado con I<sup>125</sup> prediluido a 200 ml de suspensión celular y se incubaron 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 separó 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.

20 Las curvas de IC<sub>50</sub> resultantes que demuestran la capacidad del anticuerpo de inhibir la unión de los péptidos IGF-I e IGF-II al receptor de IGF-I se muestran en las figs. 4, 5 y 6. Se muestran los resultados para el anticuerpo αIR3 en las figs. 5 y 7.

25

### Ejemplo 8

Ensayo de competición de anticuerpos para la unión de IGF-IR

30 Para el mapeado de epítomos de los anticuerpos monoclonales anti-IGF-IR, se seleccionó un formato similar al de la medición por afinidad (Ejemplo 2). Se unió el anticuerpo 1a a anticuerpos anti-Fcy humanos (de conejo), que se acoplaron mediante aminas a la superficie de un chip. Para determinar si otro anticuerpo se dirigía contra un epítomo de IGF-IR solapante con el epítomo reconocido por el anticuerpo 1a, se preincubó IGF-IR con dicho anticuerpo bajo condiciones saturantes en solución. Tras la incubación durante por lo menos 30 minutos a temperatura ambiente, se inyectó el IGF-IR con anticuerpo preligado en la celda de flujo y se realizó un seguimiento de la unión al anticuerpo 1a de referencia en la superficie del chip. En el caso del reconocimiento de epítomos solapantes de anticuerpo de ensayo y anticuerpo 1A de referencia, la unión de IGF-IR resultó inhibida en por lo menos el 10%, comparado con la señal de unión de IGF-IR solo (señal de unión del 100%) a una concentración estándar de 50 nM. En el caso de la unión de anticuerpo adicional, se incrementó la señal de unión de IGF-IR en por lo menos el 10%, indicando el reconocimiento de un epítomo ligante independiente en IGF-IR por parte del anticuerpo de ensayo.

40

### Ejemplo 9

Inhibición de la fosforilación mediada por IGF-I de IGF-IR y Akt/PKB

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

50 Se sembraron en placas células tumorales humanas (HT29, H322M NCI, 5x10<sup>4</sup>/ml) en medio RPMI 1640 (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 calor al 0,5% (PAA, nº de cat. A15-771). Para la determinación de los valores de IC<sub>50</sub>, 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 CO<sub>2</sub>.

55 Tras 48 horas de cultivo con medio bajo en suero, se eliminó cuidadosamente el medio y se sustituyó por diferentes concentraciones de anticuerpo diluido en el medio respectivo. Tras 5 minutos de incubación a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub>, se añadió péptido IGF-I a una concentración final de 2 nM y las células se incubaron nuevamente durante 10 minutos bajo las condiciones indicadas anteriormente. Se eliminó cuidadosamente el medio mediante aspiración y se añadieron 100 ml de tampón de lisis frío a cada pocillo (Hepes 50 mM, pH 7,2, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, glicerol al 10%, Triton<sup>®</sup>-X100 al 1%, NaF 100 mM, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 10 mM, inhibidor de proteasa Complete<sup>®</sup>). Se desprendieron las células utilizando un raspador celular (Corning, nº de cat. 3010) y el contenido de los pocillos se transfirió a tubos de reacción Eppendorf. Los fragmentos celulares se eliminaron mediante centrifugación durante 10 minutos a 13.000 rpm y 4°C y la mitad del sobrenadante se añadió a 2x tampón para muestras de Laemmli en una proporción 1:1 (v/v). Para la inmunoprecipitación de IGF-IR, 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 60 1 ml de anticuerpo primario (C-20, Santa Cruz Biotechnologies, mAb 24-55, GroPep). Tras 2 horas de incubación a 65

4°C en un tubo de reacción Eppendorf giratorio, se añadieron 25 ml 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 someter a ebullición las perlas en tampón para muestras Laemmli, las proteínas celulares se separaron 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 para fosfotirosina (<P-Tyr>, Upstate, clon 4G10, nº de cat. 05-321) para determinar el estado de fosforilación de IGF-IR inmunopurificado. Para la detección de Akt/PKB fosforilado, se aplicó un anticuerpo con especificidad para Ser473 fosforilado (<P-PkB>, Cell Signalling, nº de cat. 9271).

En la fig. 8 se muestra el bloqueo observado de fosforilación inducida por IGF-I tanto de IGF-IR como de Akt/PKB.

### Ejemplo 10

Inducción de la regulación negativa mediada por anticuerpos de IGF-IR *in vitro*.

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

Se sembraron en placas células tumorales humanas (HT29, QG56, MCF-7, 5x10<sup>4</sup> células/ml) en medio RPMI 1640 (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 calor al 10% (PAA, nº de cat. A15-771). Para cada periodo de incubación, se inocularon placas de 12 pocillos con 1 ml de células en el medio respectivo para cada experimento y se cultivaron durante 24 horas a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub>.

Se separó cuidadosamente el medio y se sustituyó por diferentes concentraciones de anticuerpo diluidas en el medio respectivo. En los dos pocillos de control, se sustituyó el medio por otro 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 CO<sub>2</sub> y se sacaron las placas para su procesamiento adicional tras 15 minutos, 24 horas y 48 horas.

Se separó cuidadosamente el medio mediante aspiración y se añadieron 100 ml de tampón de lisis frío a cada pocillo (Hepes 50 mM, pH 7,2, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, glicerol al 10%, Triton®-X100 al 1%, NaF 100 mM, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 10 mM e inhibidor de proteasa Complete®). Se desprendieron las células utilizando un raspador celular (Corning, nº de cat. 3010) y el contenido de los pocillos se transfirió a tubos de reacción Eppendorf. Los fragmentos celulares se eliminaron mediante centrifugación durante 10 minutos a 13.000 rpm y 4°C y el sobrenadante se añadió a 2x tampón para muestras de Laemmli en una proporción 1:1 (v/v). Las proteínas celulares se separaron 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-IR (<IGF-IR>, C-20, Santa Cruz Biotechnologies, nº de cat. sc-713) para determinar los niveles de proteína de IGF-IR.

Se observó la regulación negativa de IGF-IR inducida por el anticuerpo de la invención pasadas únicamente 24 horas de la adición del anticuerpo. Se muestran los resultados en la fig. 9.

### Ejemplo 11

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

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 células 3T3-NIH (1x10<sup>5</sup>/ml) que expresaban recombinantemente un número elevado (>10<sup>5</sup>) de IR humano, en medio MEM-Dulbecco (DMEM) rico en glucosa (PAA, nº de cat. E15-009) suplementado con L-glutamina 2 mM (Gibco, nº de cat. 25030-024) y FCS al 10% inactivado por calor (PAA, nº de cat. A15-771). En seis botellas del formato T175 se inocularon 20 ml de células en el medio respectivo para cada experimento y se cultivaron durante dos días a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub> con el fin de obtener monocapas celulares confluentes.

Para la recolección de células individuales, se añadieron 2 ml de 1x tripsina/EDTA (Gibco, nº de cat. 25300-054) a cada matraz T175 y se realizó un seguimiento del desprendimiento de las células utilizando un microscopio. Se recogieron las células y se añadió medio con FCS al 10% tal como se ha descrito anteriormente a un volumen total de 50 ml. Las células se aislaron nuevamente 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, MgSO<sub>4</sub> 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 la densidad a 1x10<sup>6</sup> células/ml con tampón de unión.

Se diluyó péptido insulina marcado con  $I^{125}$  (Amersham, nº de cat. IM166, ~2000 Ci/mmol), solubilizado en  $CH_3COOH$  al 0,1%, en tampón de unión hasta obtener una actividad final de  $4 \times 10^5$  pulsos/(minuto x ml). Se añadieron 75 ml de anticuerpo conjuntamente con 25 ml de péptido insulina marcado con  $I^{125}$  prediluido a 200 ml de suspensión celular (concentración de anticuerpo final: 200 nM) y se incubaron durante 3,5 horas a 4°C. Las células se aislaron nuevamente mediante centrifugación durante 5 minutos a 2.000 rpm y se separó 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.

Los resultados demuestran que el anticuerpo de la invención no interfiere con la unión del ligando insulina al receptor de insulina (fig. 10).

### Ejemplo 12

Inducción de la regulación negativa del receptor en diferentes tipos tumorales  
Se indujeron tumores humanos (NCI-H322M o NCI-H460) en ratones desnudos y se trataron con el anticuerpo de la invención tal como se ha indicado en el Ejemplo 6. Tras la terminación del experimento, 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,  $Na_3VO_4$  1 mM,  $Na_4P_2O_7$  10 mM, inhibidor de proteasa Complete<sup>®</sup>, PMSF 1 mM) en una proporción de volumen de tampón a peso de tumor de 3:1 y se mezcló completamente con el homogenado tumoral descongelado. Tras solubilizar el tejido durante 15 minutos sobre hielo, se eliminaron los fragmentos insolubles mediante centrifugación durante 10 minutos a 13.000 rpm y a 4°C. Se determinó la concentración de proteínas de las muestras con los reactivos Micro BCA<sup>®</sup> (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). Las proteínas celulares se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN<sup>®</sup> BA 85, Schleicher&Schuell, nº de cat. 10 401196) mediante transferencia western semiseca. Se utilizó un anticuerpo específico para IGF-IR (C-20, Santa Cruz Biotechnologies, nº de cat. sc-713) para detectar el IGF-IR.

Se observó una reducción drástica de los niveles de IGF-IR en todos los tumores tratados con el anticuerpo de la invención (fig. 11), correspondiente a los resultados de los experimentos de regulación negativa *in vitro*.

### Ejemplo 13

Reactividad cruzada de los anticuerpos con IGF-IR de rata, ratón, tití y mono Cynomolgus  
Se sometió a ensayo el anticuerpo de la invención para su capacidad de unirse al receptor de IGF-I de otras especies. Se llevaron a cabo experimentos de inmunoprecipitación con el anticuerpo de la invención y lisados de tejidos o células de diferentes especies animales.

Se homogeneizó tejido animal congelado 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,  $Na_3VO_4$  1 mM,  $Na_4P_2O_7$  10 mM, inhibidor de proteasa Complete<sup>®</sup> y PMSF 1 mM) en una proporción de volumen de tampón a peso de tumor de 3:1 y se mezcló completamente con el homogenado tumoral descongelado. Tras solubilizar el tejido durante 15 minutos sobre hielo, se eliminaron los fragmentos insolubles mediante centrifugación durante 10 minutos a 13.000 rpm y a 4°C. Se determinó la concentración de proteínas de las muestras con los reactivos Micro BCA<sup>®</sup> (Pierce) y se añadió tampón de lisis para ajustar a concentraciones iguales. Se solubilizaron las células animales siguiendo el protocolo para las líneas de células tumorales (Ejemplo 10).

Para la inmunoprecipitación de IGF-IR, los lisados celulares y de tejidos (1 mg de proteínas totales) se sometieron a una centrifugación de clarificado (10 minutos a 13.000 rpm y a 4°C) inmediatamente antes de la adición de 2 mg de anticuerpo 1A primario. También se llevó a cabo el mismo experimento con un anticuerpo humano de control no relacionado dirigido contra la proteína del virus de la hepatitis B (VHB), como medida de la unión no específica. Tras 2 horas de incubación a 4°C en un tubo de reacción Eppendorf giratorio, se añadieron 25 ml de perlas de proteína G-Sepharose<sup>®</sup> (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 a 4°C) y se lavaron tres veces con tampón de lavado (tampón de lisis con sólo Triton<sup>®</sup>-X100 al 0,1%). Tras someter a ebullición las perlas en tampón para muestras Laemmli, las proteínas celulares se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN<sup>®</sup> BA 85, Schleicher&Schuell, nº de c at. 10 401196) mediante transferencia western semiseca.

Se utilizó un anticuerpo específico de IGF-IR con amplia reactividad cruzada para diferentes especies (C-20, Santa Cruz Biotechnologies, nº de cat. sc-713) para determinar los niveles de IGF-IR inmunoprecipitado con el anticuerpo de la invención.

Se observó reactividad cruzada con IGF-IR de los monos Cynomolgus y tití (fig. 12), pero ninguna reactividad

cruzada con el receptor de IGF-IR de rata o de ratón.

#### Ejemplo 14

##### 5 ELISA de unión de C1q

###### Introducción

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

15 En principio, la placa ELISA se recubre con los intervalos de concentraciones del anticuerpo, a la que se añade el C1q humano. Se detecta la unión de C1q con un anticuerpo dirigido contra C1q humano, seguido de un conjugado marcado con peroxidasa.

###### Materiales y métodos

20 Los anticuerpos 1A, 8 y 23 y los anticuerpos de control se sometieron a ensayo a las concentraciones de 10, 5, 1 y 0,5 mg/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 0,5 mg/ml), que se une a C1q muy débilmente. Se incorporó IgG1 humana a modo de control positivo. Se utilizó solución madre de C1q humano de una concentración de 2 mg/ml. Para la detección de C1q, se utilizó un anticuerpo de conejo dirigido contra C1q (Dako) y un anticuerpo anti-IgG de conejo, conjugado con peroxidasa de rábano picante (Sigma).

###### Cálculos y ajuste de curva

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

##### 30 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 mediante regresión no lineal. Los valores de ajuste óptimo para la unión máxima (Bmax) se indican en la Tabla 4, 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 muestra una unión máxima de 1,729 y 2,223, respectivamente.

Tabla 4:

Unión máxima (Bmax) del HuMab sometido a ensayo en el ELISA de unión de C1q (n=3)				
Valores de ajuste óptimo	Bmax	Desviación estándar 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 1A	1,670	0,601	0,988	0,005
Anticuerpo 8	1,954	0,131	0,978	0,009
Anticuerpo 23	1,872	0,558	0,990	0,004

40 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 eran igualmente capaces de fijar el C1q.

##### 45 Ejemplo 15

###### Determinación de las funciones efectoras mediadas por anticuerpos de los HuMabs anti-IGF-IR

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

dependiente de anticuerpos (ADCC).

5 Con el fin de estudiar la CDC (National Cancer Institute, línea celular de adenocarcinoma pulmonar), se marcaron células H322M, H460 y 3T3 NIH ( $2-6 \times 10^6$ ) con 100 mCi de  $Cr^{51}$  durante 45 a 120 minutos (Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido, nº de cat. CJS11). Tras marcar las células, se lavaron dos veces con 40 ml de PBS y se centrifugaron durante 3 minutos a 1.500 rpm. A continuación, las células se sembraron a razón de 5.000 en cada pocillo de una placa de fondo redondo, en un volumen de 50 ml. Se añadieron anticuerpos a una concentración final comprendida entre 25 y 0,1 ng/ml en un volumen de 50 ml de medio de cultivo celular a 50 ml de suspensión celular y se incubaron durante 30 a 60 minutos. Tras la incubación, se eliminó el exceso de anticuerpo mediante dos lavados con PBS. Se añadieron 100 ml de suero humano, de cobaya, conejo o ratón desnudo agrupado, activo o inactivo (30 minutos a 56°C), diluido entre 1/3 y 1/30, y las células se incubaron durante 3 horas, después de lo cual se peletizaron las células a 1.500 rpm durante 3 minutos. Se recolectaron 100 ml del sobrenadante, se transfirieron a tubos de polipropileno y se realizó un recuento en un contador  $\gamma$ .

15 Con el fin de estudiar los efectos de los anticuerpos en la ADCC, las células H322M, H460 y 3T3 NIH u otras células adecuadas que expresasen IGF-IR ( $2-6 \times 10^6$ ) se marcaron con 100 mCi de  $Cr^{51}$  durante 45 a 120 minutos (Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido, nº de cat. CJS11), se lavaron dos veces con 40 ml de PBS y se centrifugaron durante 3 minutos a 1.500 rpm. Las células se sembraron a razón de 5.000 en cada pocillo de una placa de fondo redondo, en un volumen de 50 ml. Se añadieron anticuerpos HuMab a una concentración final comprendida entre 25 y 0,1 mg/ml en un volumen de 50 ml de medio de cultivo celular a 50 ml de suspensión celular y se incubaron durante 15 minutos. A continuación, se añadieron 50 ml de células efectoras, PBMC recién aisladas o células efectoras purificadas procedentes de capas leucocitarias, en una proporción E:T comprendida en el intervalo de entre 100:1 y 5:1. Se centrifugaron las placas 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 ml del sobrenadante, se transfirieron a tubos de polipropileno y se realizó un recuento en un contador  $\gamma$ .

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

#### Lista de referencias

- 35 Adams, T.E., *et al.*, Cell. Mol. Life Sci. 57 (2000) 1050-1063  
 Aplin, J.D., and Wriston, J.C. Jr., CRC Crit. Rev. Biochem. (1931) 259-306  
 Arteaga, C.L., *et al.*, Breast Cancer Res. Treatment 22 (1992) 101-106  
 Ausubel, F., *et al.*, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)  
 40 Barnes, L.M., *et al.*, Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261-270  
 Barnes, L.M., *et al.*, Cytotechnology 32 (2000) 109-123  
 Benini, S., *et al.*, Clin. Cancer Res. 7 (2001) 1790-1797  
 Berge, S.M., *et al.*, J. Pharm. Sci. 66 (1977) 1-19  
 Brüggemann, M., *et al.*, J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361  
 Brunetti, A., *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 165 (1989) 212-218  
 45 Carter, P., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289  
 Chen, J., *et al.*, EMBO J.12 (1993) 821-830  
 Chen, J., *et al.*, International Immunology 5 (1993) 647-656  
 Choi, T.K., *et al.*, Nature Genetics 4 (1993) 117-123  
 Delafontaine, P., *et al.*, J. Mol. Cell. Cardiol. 26 (1994) 1659-1673  
 50 Dricu, A., *et al.*, Glycobiology 9 (1999) 571-579  
 Durocher, Y., *et al.*, Nucl. Acids. Res. 30 (2002) E9  
 Edge, A.S., *et al.* Anal. Biochem. 118 (1981) 131-137  
 Fishwild, D.M., *et al.*, Nat. Biotechnol. 14 (1996) 845-851  
 Forsayeth, J.R., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 3448-3451  
 55 Gallicchio, M.A., *et al.*, Int. J. Cancer 94 (2001) 645-651  
 Geisse, S., *et al.*, Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282  
 Gustafson, T.A., and Rutter, W.J., J. Biol. Chem. 265 (1990) 18663-18667  
 Hailey, J., *et al.*, Mol. Cancer Ther. 1 (2002) 1349-1353  
 Harding, F., and Lonberg, N., Ann. N. Acad. Sci 764 (1995) 536-546  
 60 Hoyne, P.A., *et al.*, FEBS Lett. 469 (2000) 57-60  
 Johnson, G., and Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218  
 Jones, P., *et al.*, Nature 321 (1986) 522-525  
 Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)  
 65 Kalebic, T., *et al.*, Cancer Res. 54 (1994) 5531-5534  
 Kanter-Lewensohn, L., *et al.*, Melanoma Res. 8 (1998) 389-397

- Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-161  
 Kull, F.C. Jr., *et al.* *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 6561-6566  
 LeRoith, D., *et al.*, *Endocrin. Rev.* 16 (1995) 143-163  
 5 Li, S.L., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196 (1993) 92-98  
 Li, S.L., *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 49 (2000) 243-252  
 Lonberg, N., and Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* 25 (1995) 65-93  
 Lonberg, N., *et al.*, *Nature* 368 (1994) 856-859  
 Lonberg, N., *Handbook of Experimental Pharmacology* 113 (1994) 49-101  
 10 Love, T.W., *et al.*, *Methods Enzymol.* 178 (1989) 515-527  
 Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202  
 Morgan, D.O., and Roth, R.A., *Biochemistry* 25 (1986) 1364-1371  
 Morrison, S.L., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 6851-6855  
 Neuberger, M.S., *et al.*, *Nature* 314 (1985) 268-270  
 15 Norderhaug, L., *et al.*, *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87  
 O'Brien, R.M., *et al.*, *EMBO J.* 6 (1987) 4003-4010  
 Orlandi, R., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3833-3837  
 Pessino, A., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162 (1989) 1236-1243  
 Prigent, S.A., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 9970-9977  
 20 Queen, C., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10029-10033  
 Riechmann, L., *et al.*, *Nature* 332 (1988) 323-327  
 Rohlik, Q.T., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 149 (1987) 276-281  
 Schaefer, E.M., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 13248-13253  
 Schlaeger, E.-J., and Christensen, K., *Cytotechnology* 30 (1999) 71-83  
 Schlaeger, E.-J., in *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199  
 25 Scotlandi, K., *et al.*, *Cancer Gene Ther.* 9 (2002) 296-307  
 Scotlandi, K., *et al.*, *Int. J. Cancer* 101 (2002) 11-16  
 Sojahr, H.T., and Bahl, O.P., *Arch. Biochem. Biophys.* 259 (1987) 52-57  
 Soos, M.A., *et al.*, *Biochem. J.* 235 (1986) 199-208  
 Soos, M.A., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 12955-12963  
 30 Soos, M.A., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 5217-5221  
 Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", *Directed Drug Delivery*, Borchardt *et al.* (editores), páginas 247-267, Humana Press (1985)  
 Surinya, K.H., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 16718-16725  
 Taylor, L., *et al.*, *Int. Immunol.* 6 (1994) 579-591  
 35 Taylor, L., *et al.*, *Nucleic Acids Research* 20 (1992) 6287-6295  
 Taylor, R., *et al.*, *Biochem. J.* 242 (1987) 123-129  
 Thotakura, N.R., and Bahl, O.P., *Meth. Enzymol.* 138 (1987) 350-359  
 Tuailon, N., *et al.*, *Immunol.* 152 (1994) 2912-2920  
 Tuailon, N., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 3720-3724  
 40 Tulloch, P.A., *et al.*, *J. Struct. Biol.* 125 (1999) 11-18  
 Patente US nº 4.179.337  
 Patente US nº 4.301.144  
 Patente US nº 4.487.603  
 Patente US nº 4.496.689  
 45 Patente US nº 4.640.835  
 Patente US nº 4.670.417  
 Patente US nº 4.675.187  
 Patente US nº 4.791.192  
 Patente US nº 5.202.238  
 50 Patente US nº 5.204.244  
 Patente US nº 5.545.806  
 Patente US nº 5.545.807  
 Patente US nº 5.569.825  
 Patente US nº 5.625.126  
 55 Patente US nº 5.633.425  
 Patente US nº 5.661.016  
 Patente US nº 5.770.429  
 Patente US nº 5.789.650  
 Patente US nº 5.814.318  
 60 Patente US nº 5.874.299  
 Patente US nº 5.877.397  
 van Dijk, M.A. y van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Pharmacol.* 5 (2001) 368-374  
 Vitetta, E.S., *et al.*, *Science* 238 (1987) 1098-1104  
 Werner, R.G., *Drug Res.* 48 (1998) 870-880  
 65 Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986)

WO 01/14424  
WO 02/053596  
WO 87/05330  
5 WO 92/03918  
WO 92/22645  
WO 93/1227  
WO 94/11026  
WO 94/25585  
10 WO 98/24884

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

5 <120> Anticuerpos contra el factor I de crecimiento similar a insulina y usos de los mismos

<130> 21655 WO

10 <150> US 60/459,837  
<151> 2003-04-02

<150> US 60/463,003  
<151> 2003-04-15

15 <160> 10

<170> PatentIn versión 3.2

20 <210> 1  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

Ser Ala Ile Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
50 55 60

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

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

Arg Ala Pro Asn Trp Gly Ser Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

25 Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 2

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

5 <400> 2  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys  
 100 105

<210> 3  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 3  
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

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

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

Arg Ala Pro Asn Trp Gly Ser Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 4  
<211> 107  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 4  
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys  
100 105

10 <210> 5  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

ES 2 383 014 T3

<400> 5

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

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

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

Ser Ala Ile Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
50 55 60

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

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

Arg Ala Pro Asn Trp Gly Ser Glu Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
115

- 5 <210> 6
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

10 <400> 6

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
20 25 30

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

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

ES 2 383 014 T3

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Ile  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
100 105

<210> 7  
<211> 990  
5 <212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
10 <221> CDS  
<222> (1) .. (990)

<400> 7  
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 288  
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc 336  
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
100 105 110

cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca 384  
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
115 120 125

aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc 432  
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
130 135 140

ES 2 383 014 T3

gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg 480  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag 528  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg 576  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac 624  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg 672  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag 720  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240

ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat 768  
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255

ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac 816  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270

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> 8  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 5 <213> Homo sapiens

<400> 8

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

ES 2 383 014 T3

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

ES 2 383 014 T3

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> 9  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 5 <213> Homo sapiens

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

10 <400> 9  
 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> 10  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

ES 2 383 014 T3

<400> 10

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

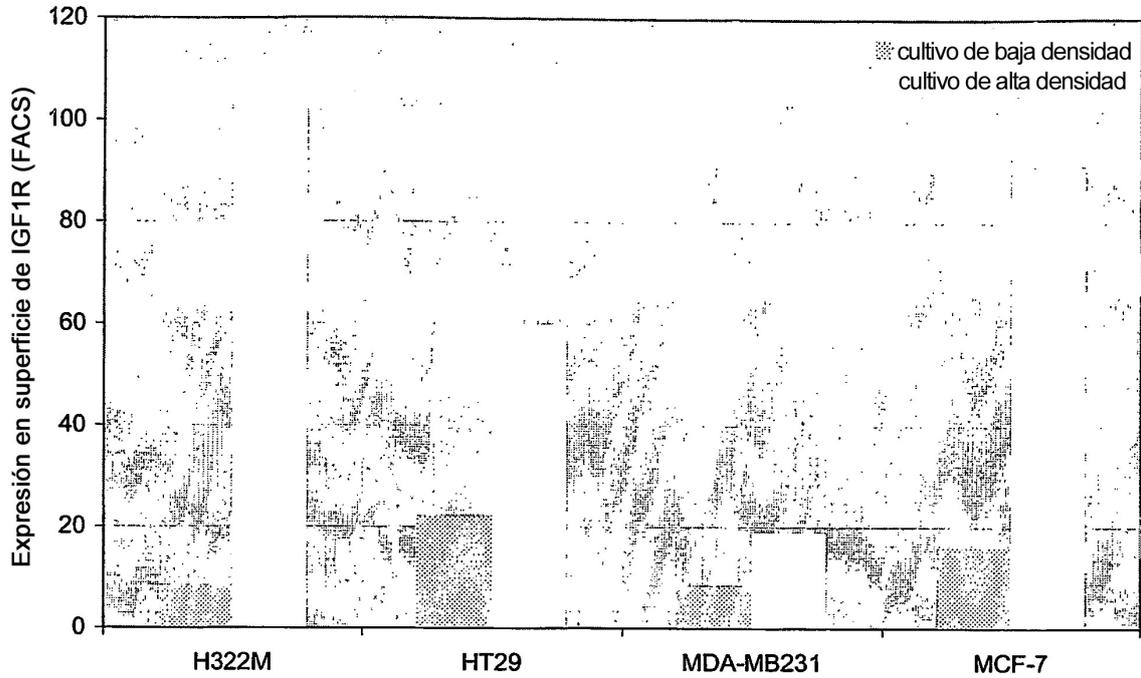
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 100 105

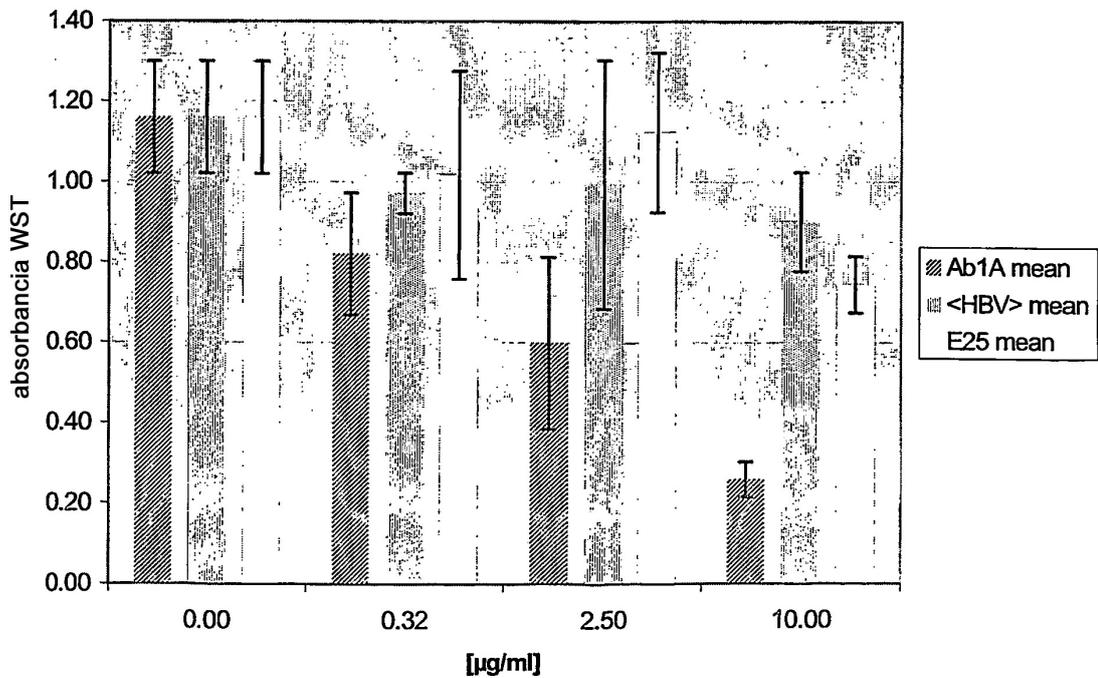
## REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo humano de unión a IGF-IR e inhibición de la unión de IGF-I e IGF-II a IGF-IR, caracterizado porque dicho anticuerpo
- 5 a) es del isotipo IgG1,  
 b) muestra un valor de IC50 para la inhibición de la unión de IGF-I e IGF-II a IGF-IR no superior a 10 nM, y  
 c) comprende una cadena pesada variable de secuencia SEC ID nº 1 y una cadena ligera variable de secuencia SEC ID nº 2, una cadena pesada variable de secuencia SEC ID nº 3 y una cadena ligera variable de secuencia SEC ID nº 4, o una cadena pesada variable de secuencia SEC ID nº 5 y una cadena ligera variable de secuencia SEC ID nº 6.
- 10
2. Anticuerpo humano de unión a IGF-IR e inhibición de la unión de IGF-I e IGF-II a IGF-IR, caracterizado porque dicho anticuerpo:
- 15 a) es del isotipo IgG1,  
 b) muestra un valor de IC50 para la inhibición de la unión de IGF-I e IGF-II a IGF-IR no superior a 10 nM,  
 c) comprende una cadena pesada variable derivada de la secuencia de línea germinal DP-61 y una cadena ligera variable derivada de la secuencia de línea germinal L15, y  
 d) comprende como CDRs de cadena pesada variable, un CDR1 de aminoácidos 31 a 35, un CDR2 de aminoácidos 50 a 65 y un CDR3 de aminoácidos 98 a 108 de secuencia SEC ID nº 1, en los que el aminoácido 31 puede ser asparagina o serina y el aminoácido 104 puede ser ácido glutámico o ácido aspártico, y como CDRs de cadena ligera variable, un CDR1 de aminoácidos 24 a 34, un CDR2 de aminoácidos 50 a 56 y un CDR3 de aminoácidos 89 a 97 de secuencia SEC ID nº 2, en los que la numeración de CDR y la definición son según Kabat.
- 20
3. Anticuerpo según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado por una afinidad de entre aproximadamente  $10^{-11}$  y  $10^{-8}$  M ( $K_D$ ).
- 25
4. Anticuerpo según las reivindicaciones 1 a 3 obtenible a partir de la línea celular de hibridoma DSM ACC 2586, DSM ACC 2588 ó DSM ACC 2589.
- 30
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.
- 35
7. Línea celular de hibridoma DSM ACC 2586, DSM ACC 2588 ó DSM ACC 2589.
8. Método para la preparación de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según las reivindicaciones 1 a 4.
- 40
9. Ácido nucleico codificante de un anticuerpo humano según la reivindicación 1 ó 2.
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 eucariótica.
- 45
11. Célula huésped procariótica o eucariótica que comprende un vector según la reivindicación 10.
12. Método para la producción de un anticuerpo humano de unión a IGF-IR e inhibición de la unión de IGF-I e IGF-II a IGF-IR, caracterizado porque se expresa un ácido nucleico según la reivindicación 9 en una célula huésped procariótica o eucariótica y se recupera dicho polipéptido a partir de dicha célula.
- 50
13. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo humano según las reivindicaciones 1 a 4 para el tratamiento del cáncer.
- 55
14. Composición farmacéutica según la reivindicación 13, en la que dicho anticuerpo humano debe administrarse en combinación con un agente citotóxico, un profármaco del mismo o una radioterapia citotóxica.

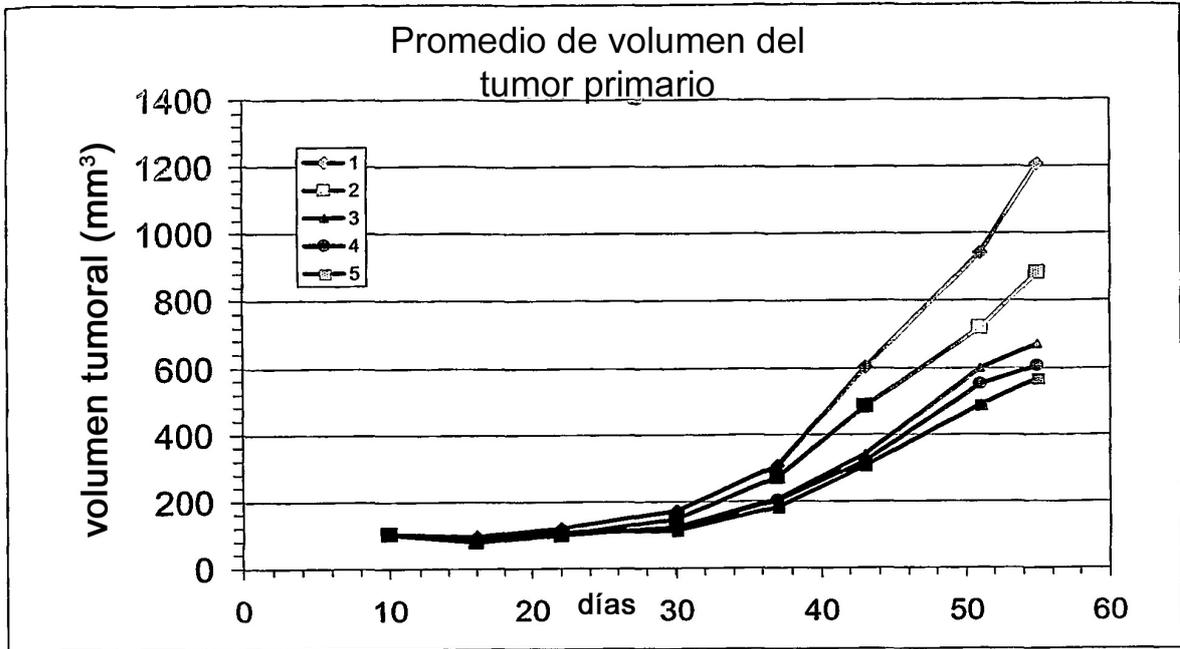
**Fig. 1**



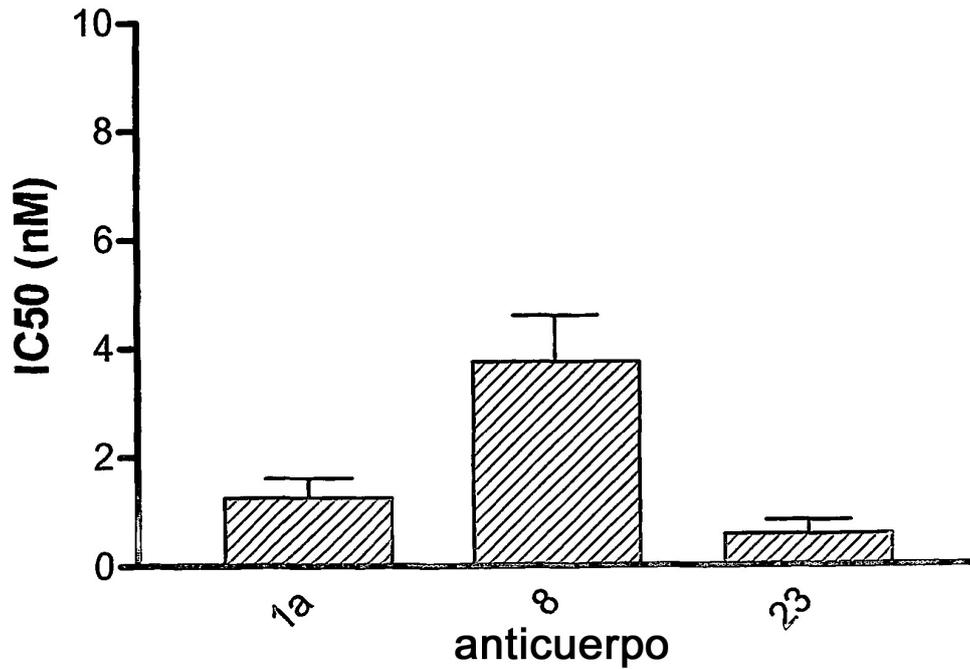
**Fig. 2**



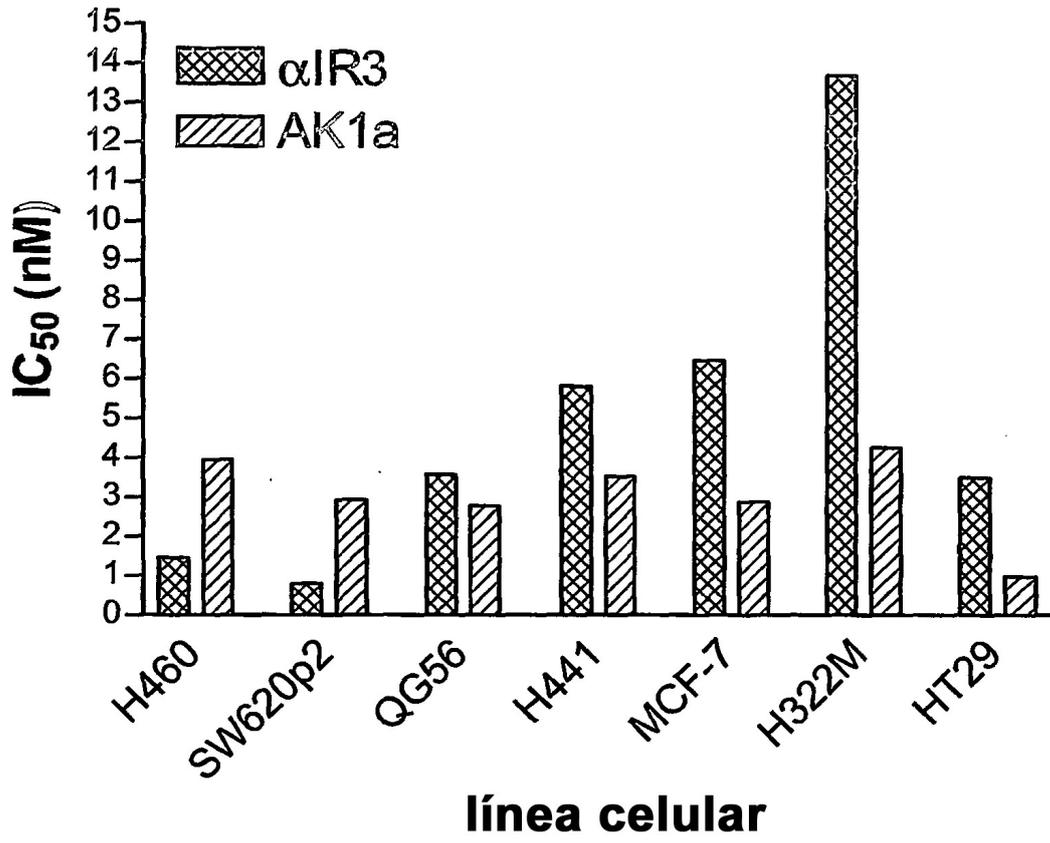
**Fig. 3**



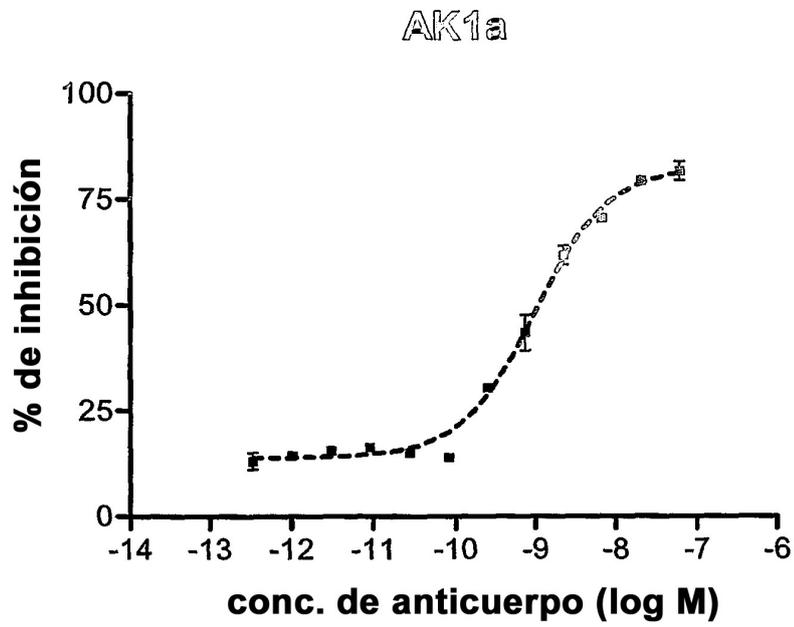
**Fig. 4**



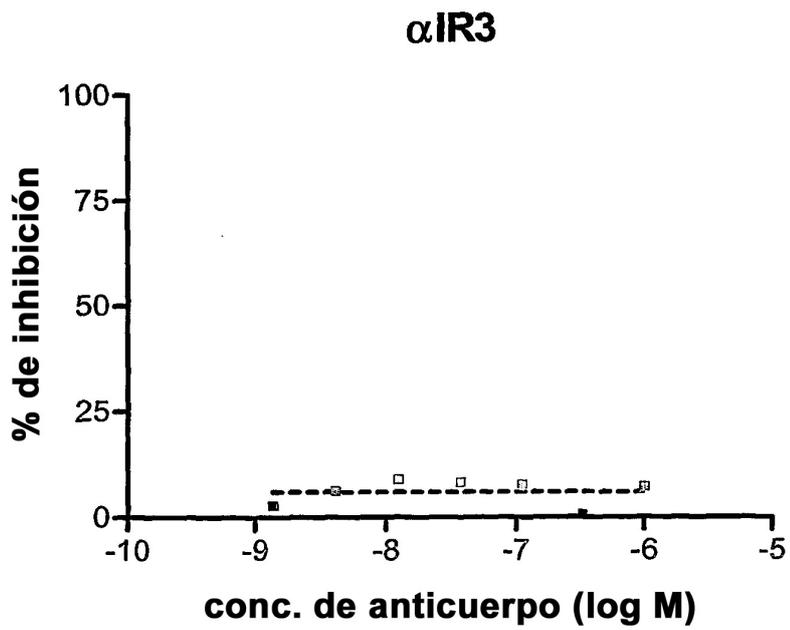
**Fig. 5**



**Fig. 6**



**Fig. 7**



**Fig. 8**

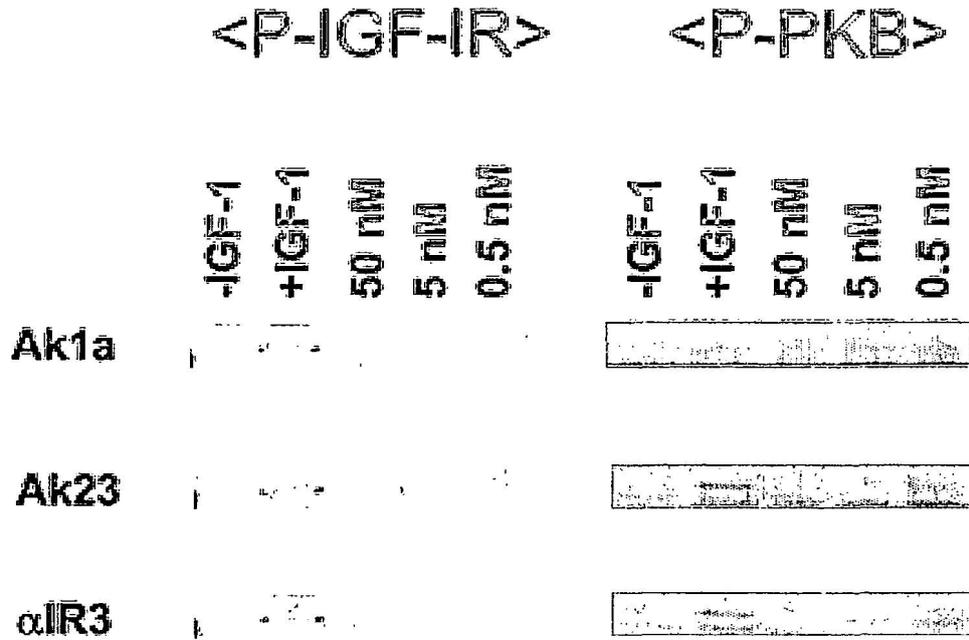
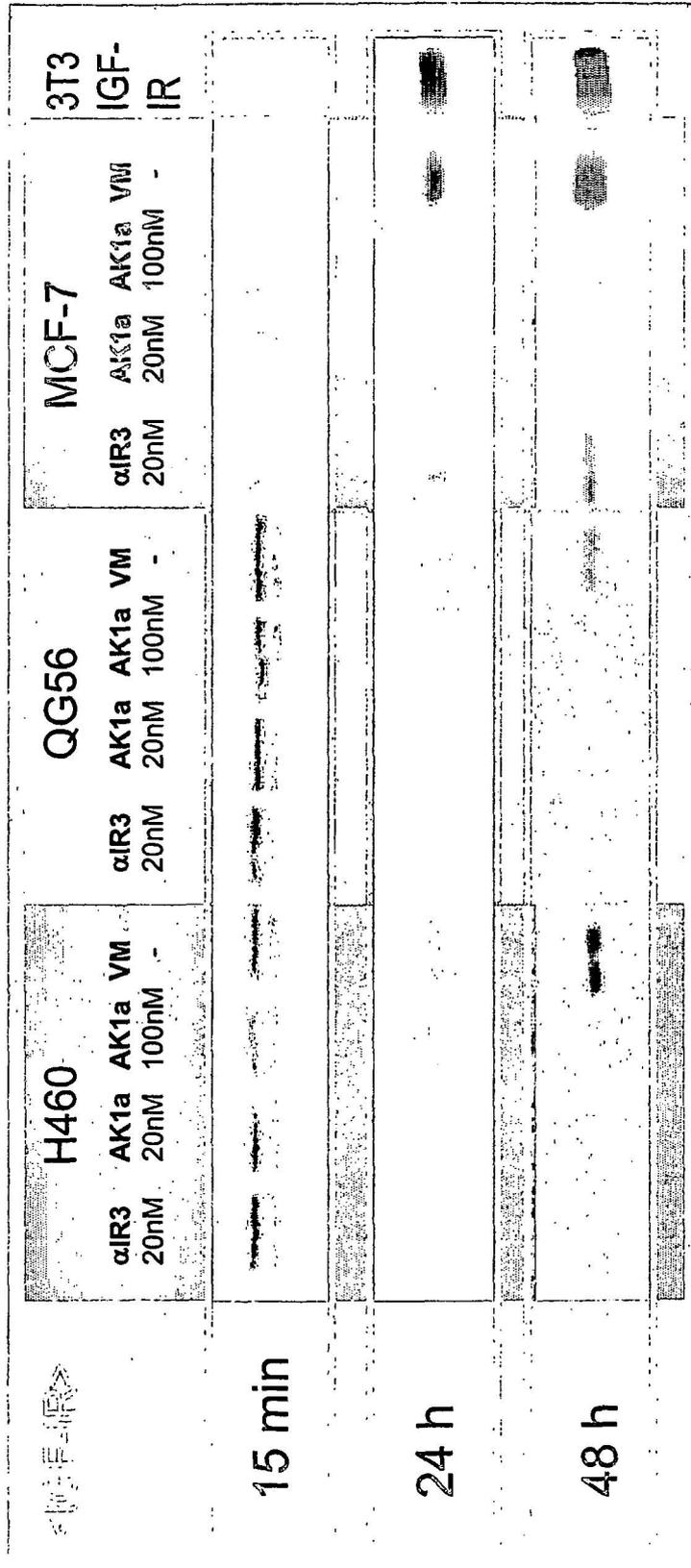
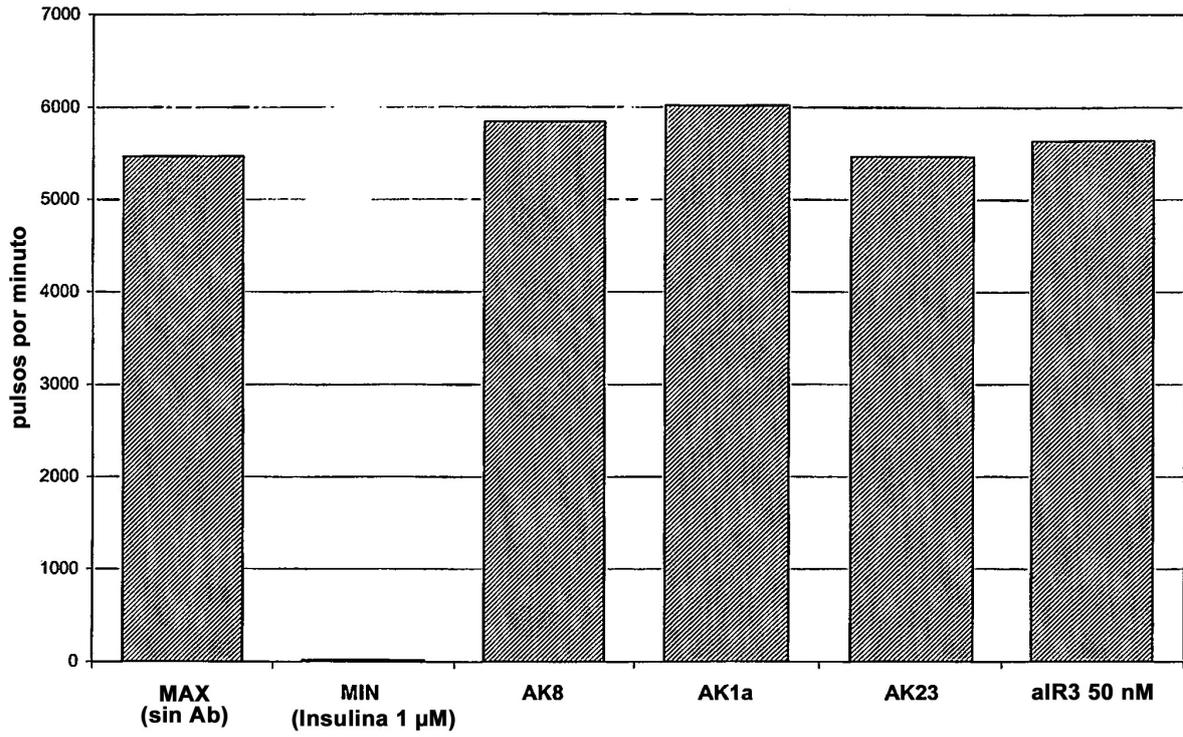


Fig. 9



**Fig. 10**

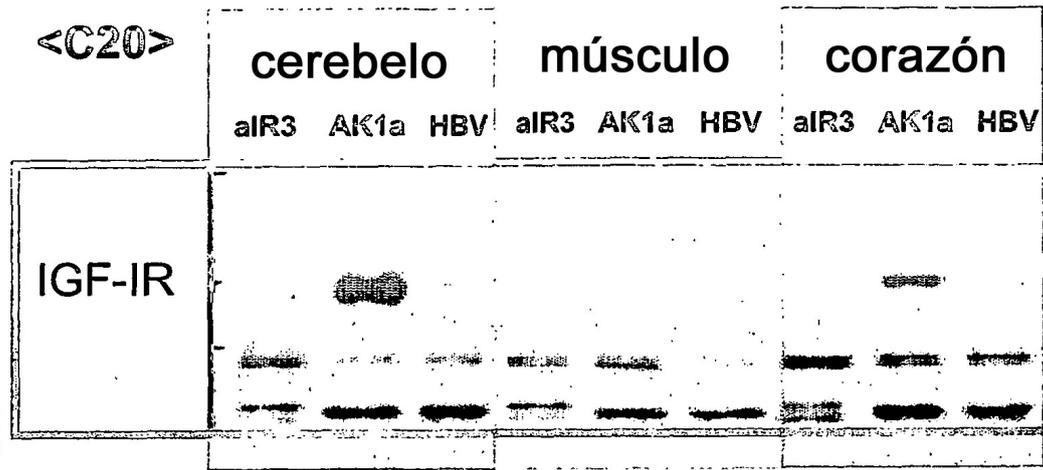


**Fig. 11**

<b>&lt;C20&gt;</b>	<b>H322M</b>	<b>M</b>	<b>H460</b>
	PBS <HBV>    Anticuerpo 1A 20    7    2 $\frac{mg}{kg}$		PBS    Anti cuerpo 1A    Veh. Veh. Taxol
<b>IGF-IR</b>			

**Fig. 12**

**tejido de mono tití**



**células de mono Cynomolgus**

