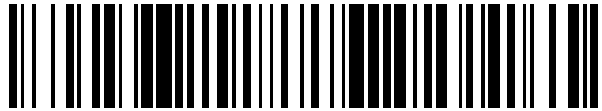


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 075**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2007 E 07724106 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.02.2013 EP 2007810**

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

30 Prioridad:

11.04.2006 EP 06007571

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

13.05.2013

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
GRENZACHERSTRASSE, 124
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**HANSEN, SILKE;
KUENKELE, KLAUS-PETER;
REUSCH, DIETMAR y
SCHUMACHER, RALF**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 403 075 T3

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

DESCRIPCIÓN

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

5 La presente invención se refiere a anticuerpos contra el receptor del factor I de crecimiento similar a la insulina (IGF-IR), a métodos para su producción, a composiciones farmacéuticas que contienen dichos anticuerpos y a usos de las mismas.

10 El receptor del factor I de crecimiento similar a la insulina (IGF-IR, EC 2.7.112, antígeno CD221) 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) 1050-1093). 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 existe evidencia de 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.* 57:1050-1093, 2000).

15 Los anticuerpos contra 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.* 57:1050-1093, 2000; Dricu A. *et al.*, *Glycobiology* 9:571-579, 1999; Kanter-Lewensohn L. *et al.*, *Melanoma Res.* 8:389-397, 1998; Li S.L. *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 49:243-252, 2000). Los anticuerpos contra IGF-IR también se han descrito en un gran número de otras publicaciones, por ejemplo en 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.

35 En particular, el anticuerpo monoclonal contra IGF-IR denominado α IR3 se utiliza ampliamente en la investigación de los procesos mediados por IGF-IR y de enfermedades mediadas por IGF-I, tales como el cáncer. El anticuerpo α -IR3 fue descrito por Kull F.C., *J. Biol. Chem.* 258:6561-6566, 1983. Desde entonces se han publicado aproximadamente cien publicaciones referentes a la investigación y el uso terapéutico de α IR3 con respecto a su efecto antitumoral, solo y conjuntamente con agentes citostáticos tales como la doxorrubicina y la vincristina. El anticuerpo α IR3 es un anticuerpo monoclonal murino que es conocido que inhibe la unión de IGF-I al receptor de IGF pero no la unión de IGF-II a IGF-IR. El anticuerpo α IR3 estimula a altas concentraciones la proliferación de las células tumorales y la fosforilación de IGF-IR (Bergmann U. *et al.*, *Cancer Res.* 55:2007-2011, 1995; Kato H. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268:2655-2661, 1993). Existen otros anticuerpos (por ejemplo 1H7, Li S.L. *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 49:243-252, 2000) que inhiben la unión de IGF-II a IGF-IR más potentemente que la unión de IGF-I. Se proporciona un resumen del estado de la técnica de los anticuerpos y sus propiedades y características en Adams T.E. *et al.*, *Cell. Mol. Life Sci.* 57:1050-1093, 2000.

50 La mayoría de los anticuerpos descritos en el estado de la técnica se originan en el ratón. Dichos anticuerpos no resultan útiles, tal como es bien conocido del estado de la técnica, para la terapia de pacientes humanos sin alteraciones adicionales 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 del estado de la técnica (van Dijk, M.A. y van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5:368-374, 2001). Basándose en dicha tecnología, pueden producirse anticuerpos humanos contra una gran diversidad de dianas. Se describen ejemplos de anticuerpos humanos contra IGF-IR en los documentos n° WO 02/053596, n° WO2004071529, n° WO2005016967, n° WO2006008639, n° US20050249730, n° US20050084906, n° WO2005058967, n° WO2006013472, n° US20030165502, n° WO2005082415, n° WO2005016970, n° WO03106621, n° WO04083248, n° WO2003100008, n° WO2004087756, n° WO2005005635 y n° WO2005094376.

60 Sin embargo, todavía existe una necesidad de anticuerpos contra IGF-IR con beneficios convincentes para los pacientes que necesitan 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.

5 Routier F.H. *et al.*, Glycoconjugate J. 14:201-207, 1997, informan del patrón de glucosilación de un anticuerpo IgG1 humanizado expresado en las células CHO-DUKX. Este anticuerpo muestra una proporción molar Fuc: Man de 0,8: 3,0, lo que equivale a una proporción de fucosilación del 80%. Niwa R. *et al.*, J. Immunol. Methods 306:151-160, 2005, informan de que los anticuerpos IgG1 e IgG3 anti-CD20 producen recombinantemente en CHO DG44 una fucosilación del 90% y 91%, respectivamente. Mimura Y. *et al.*, J. Immunol. Methods 247:205-216, 2001, informan de que el butirato incrementa la producción de IgG quimérica humana en células CHO-K1, manteniendo la función y el perfil de glicofomas. Los perfiles de oligosacáridos muestran un contenido considerable de estructuras de glicano afucosiladas. Raju T.S., BioProcess International 1:44-53, 2003, informan del impacto de la variación de la glucosilación por parte de los sistemas de expresión sobre la actividad biológica de las inmunoglobulinas terapéuticas y la nomenclatura. Ma S. *et al.*, Anal. Chem. 71:5185-5192, 1999, informan del análisis de carbohidratos del rituximab. El rituximab muestra una fucosilación de 9-10% (Niwa R. *et al.*, J. Immunol. Methods 306:151-160, 2005). Fujii S., J. Biol. Chem. 265:6009-6018, 1990, informan de que la IgG bovina incluye aproximadamente 11% de IgG afucosilada. Mizuochi T., J. Immunol. 129:2016-2020, 1982, informan de que la IgG humana se encuentra afucosilada aproximadamente al 14%. Bergwerff A.A., Glycoconjugate J. 12:318-330, 1995, informan de que los anticuerpos producidos en ratones SP2/0 contienen oligosacáridos ácido N-glicolilneuramínico (NGNA) en grandes cantidades. Nahrgang S. *et al.*, en: Animal Cell Technology: Products from Cells, Cells as Products, Bernard A. *et al.* (editores), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, 1999, páginas 259 a 261, informan de que para la expresión en CHO de IgG1 tras la transfección transitoria, se observa una glucosilación global reducida. Lund J. *et al.*, Mol. Immunol. 30:741-748, 1993, informan de la producción recombinante de un anticuerpo quimérico de ratón-humano en células de transfectoma de ratón. El anticuerpo IgG1 se encuentra afucosilado en una cantidad de 13%. Patel T.P. *et al.*, Biochem. J. 285:839-845, 1992, informan de la glucosilación de anticuerpos procedentes de células de hibridoma y de ascites de ratón. Niwa R. *et al.*, J. Immunol. Methods 306:151-160, 2005, informan de una fucosilación para el anticuerpo IgG1 anti-CD20 de 91% tras la producción recombinante en CHO DG44, y Mori K. *et al.*, Biotech. Bioeng. 88:901-908, 2004, de una fucosilación del 94%. Davies J. *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 74:288-294, 2001, informan de que la expresión de anticuerpos con glicofomas alteradas conduce a un incremento de la ADCC. Sheeley D.M. *et al.*, Anal. Biochem. 247:102-110, 1997, comparan la glucosilación de anticuerpos en diferentes sistemas de expresión. Shields R.L. *et al.*, J. Biol. Chem. 277:26733-26740, 2002, informan de que la falta de fucosa en la Fc de la IgG1 humana mejora la unión de FcγRIII y la ADCC. Un anticuerpo anti-Her2 que está fucosilado aproximadamente al 90% también muestra ADCC a un nivel considerable. Zhu L. *et al.*, Nature Biotechnol. 23:1159-1169, 2005, informan de la producción de anticuerpos humanos en huevos de pollo.

35 Descripción resumida de la invención

La invención da a conocer un anticuerpo que se une a IGF-IR, siendo de tipo IgG1 ó IgG3 humano y encontrándose glucosilado con una cadena sacárida en Asn297, caracterizándose dicho anticuerpo porque la cantidad de fucosa en dicha cadena sacárida es de por lo menos el 98% ("completamente fucosilado", ver las versiones preferentes posteriormente) y además la cantidad de NGNA es de 1% o inferior y/o la cantidad de α-1,3-galactosa N-terminal es de 1% o inferior.

45 Según la invención, "cantidad" se refiere a que la cantidad de dicho azúcar dentro de la cadena sacárida en Asn297, en referencia a la suma de G0, G1 y G2 (sin manosa (4 y 5)), es de 100% y tal como se calcula en el Ejemplo 3.

Según la invención, resulta posible proporcionar anticuerpos que se unen a IGF-IR con una fucosilación de incluso 99,4% o más, de 99,5% o más o de 99,9% o más.

50 Preferentemente, la cantidad de NGNA es de 0,5% o menos, más preferentemente de 0,1% o menos, e incluso no detectable por la CL-EM (cromatografía líquida/espectrometría de masas).

Preferentemente, la cantidad de α-1,3-galactosa N-terminal de 0,5% o menos, más preferentemente de 0,1% o menos, e incluso no detectable por la CL-EM.

55 La cadena sacárida muestra preferentemente las características de los glicanos N-ligados unidos a Asn297 de un anticuerpo de unión a IGF-IR expresado recombinantemente en una célula CHO (de ovario de hámster chino).

60 Preferentemente, la célula CHO es una célula CHO que comprende la delección (por ejemplo DG44) o la inactivación funcional de ambos alelos DHFR o una delección de un alelo DHFR y una inactivación funcional del segundo alelo DHFR (por ejemplo DXB11).

El anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo es un anticuerpo humano.

La invención da a conocer un anticuerpo completamente fucosilado de unión a IGF-IR y la inhibición de la unión de IGF-I e IGF-II a IGF-IR, caracterizado porque dicho anticuerpo muestra una o más propiedades seleccionadas de entre el grupo que consiste de:

- 5
- a) muestra una proporción de valores de IC₅₀ de inhibición de la unión de IGF-I a IGF-IR a inhibición de la unión de IGF-II a IGF-IR de entre 1:3 y 3:1.
 - b) inhibe por lo menos al 80%, preferentemente por lo menos al 90%, a una concentración de 5 nM de IGF-IR la fosforilación en un ensayo de fosforilación celular con células HT29 en un medio que contiene suero de feto bovino (FCS) al 0,5% inactivado por calor en comparación con dicho ensayo sin dicho anticuerpo.
 - 10 c) no muestra actividad estimuladora de IGF-IR (señalización nula, sin actividad mimética de IGF-I) medida como fosforilación de PKB a una concentración de 10 mM en un ensayo de fosforilación celular con células 3T3, proporcionando 400.000 a 600.000 moléculas de IGF-IR por célula en un medio que contiene suero de feto bovino (FCS) al 0,5% inactivado por calor en comparación con dicho ensayo sin dicho anticuerpo.
 - 15 d) regula negativamente 50% o más del IGF-IR expresado sobre una célula tumoral (por ejemplo HT29) 24 horas después de la adición del anticuerpo a la célula.

Los anticuerpos según la invención muestran beneficios para los pacientes que necesitan terapia antitumoral y proporciona una reducción del crecimiento tumoral y una prolongación significativa del tiempo hasta la progresión. Los anticuerpos según la invención presentan propiedades nuevas e inventivas que causan un beneficio para un paciente que sufre una enfermedad asociada a la desregulación de IGF, especialmente una enfermedad tumoral. Inesperadamente, un anticuerpo según la invención ("anticuerpo completamente fucosilado") no causa ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos) (dentro de 3xSD (desviaciones estándares) respecto al anticuerpo estándar de referencia (anticuerpo contra la hemocianina de lapa americana, anticuerpo KLH), tal como se observa en el ensayo de ADCC descrito en el Ejemplo).

Preferentemente, el anticuerpo se une específicamente a IGF-IR, inhibiendo la unión de IGF-I e IGF-II a IGF-IR a la proporción anteriormente indicada, es del isotipo IgG1, y no activa la señalización de IGF-IR, ni siquiera en células sobreexpresantes de IGF-IR a una concentración de 200 veces su valor de IC₅₀.

Los anticuerpos que se unen a IGF-IR, al no presentar "actividad mimética de IGF-I" en combinación con una "fucosilación completa" proporcionan una fuerte ventaja al utilizarse como agente terapéutico.

A una concentración de 5 nM los anticuerpos según la invención inhiben completamente la transducción de señales de IGF-IR mediada por IGF-I en las células tumorales.

Los ácidos nucleicos de polipéptidos que pueden ensamblarse, conjuntamente con la otra cadena de anticuerpo respectiva, a un anticuerpo según la invención se definen a continuación:

- 40 a) una cadena pesada de anticuerpo que comprende como CDR, CDR1 (aa 31 a 35), CDR2 (aa 50 a 66) y CDR3 (aa 99 a 107) de la SEC ID n° 1,
- b) una cadena ligera de anticuerpo que comprende como CDR, CDR1 (aa 24 a 34), CDR2 (aa 50 a 56) y CDR3 (aa 89 a 98) de la SEC ID n° 2.

45 El anticuerpo es un anticuerpo monoclonal y, además, un anticuerpo humano.

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

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

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

55 El anticuerpo es de tipo IgG1.

El anticuerpo según la invención prolonga considerablemente el tiempo hasta la progresión en modelos tumorales de xenoinjerto relevantes 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 manera aproximadamente igual para IGF-I que para IGF-II.

El anticuerpo según la invención comprende como regiones determinantes de complementariedad (RDC) las

secuencias siguientes:

a) una cadena pesada de anticuerpo que comprende como CDR, CDR1 (aa 31 a 35), CDR2 (aa 50 a 66) y CDR3 (aa 99 a 107) de la SEC ID nº 1,

b) una cadena ligera de anticuerpo que comprende como CDR, CDR1 (aa 24 a 34), CDR2 (aa 50 a 56) y CDR3 (aa 89 a 98) de la SEC ID nº 2.

Las regiones variables y CDR preferentes, especialmente la CDR3 de la cadena pesada de los anticuerpos según la invención son proporcionadas por <IGF-IR> HUMAB Clon 18 (anticuerpo 18), depositado en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Alemania.

Línea celular	nº de depósito	Fecha de depósito
<IGF-1R> HUMAB-Clon 18	DSM ACC 2587	10.04.2003

Estos anticuerpos se describen en detalle en la solicitud de patente WO nº 2005/005635.

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

La invención da a conocer además métodos para tratar el cáncer, que comprenden administrar en un paciente en el que se ha diagnosticado cáncer (y que por lo tanto necesita una terapia antitumoral), una cantidad efectiva de un anticuerpo antagonista contra IGF-IR 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.

La invención da a conocer 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.

La invención da a conocer 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.

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

La invención da a conocer además un método para la producción de un anticuerpo humano recombinante según la invención, caracterizado por la expresión de un ácido nucleico codificante de un anticuerpo de unión a IGF-IR en una célula huésped CHO, que fucosila completamente dicho anticuerpo y la recuperación de dicho anticuerpo a partir de dicha célula. La invención comprende además el anticuerpo obtenible mediante dicho método recombinante.

Breve descripción del dibujo

La figura 1 es un gráfico de columnas que muestra la actividad de ADCC o la falta de la misma en anticuerpos de la invención y en anticuerpos de control y comparativos.

Descripción detallada de la invención

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

La expresión "fragmentos de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente por lo menos la porción de unión a antígeno o la región variable del mismo. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen diacuerpos, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla, inmunotoxinas y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

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 composición de un único aminoácido. 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.

La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable, es decir una región de unión, procedente de una fuente o especie y por lo menos una porción de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, habitualmente preparada 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-50 (GenBank nº LO6618) y la cadena ligera variable preferentemente se deriva de la secuencia de línea germinal L6 (GenBank nº X01668) o la cadena pesada variable preferentemente se deriva de DP-61 (GenBank nº M99682) y la cadena ligera variable se deriva a partir 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 las bases de datos referencias en la misma.

La expresión "anticuerpo humano recombinante" se refiere a anticuerpos que presentan regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana en una forma reorganizada. Los anticuerpos recombinantes humanos según la invención han sido sometidos a hipermutación somática *in vivo*. De esta manera, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de las secuencias VH y VL de la línea germinal humana y relacionadas con la misma, podrían no existir naturalmente en el repertorio *in vivo* de anticuerpos de la línea germinal humana.

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

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

Se describen en detalle dominios constantes humanos de tipo IgG1 ó IgG3 en Kabat E.A. *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 SEC ID nº 5 a nº 8. Otros dominios constantes útiles y preferentes son los dominios constantes de los anticuerpos obtenibles de las líneas celulares de hibridoma depositados en DSMZ para la presente invención.

Los dominios constantes de tipo IgG1 ó IgG3 se glucosilan en Asn297. "Asn297" según la invención se refiere al aminoácido asparagina situado en aproximadamente la posición 297 en la región Fc; basándose en variaciones de secuencia menores de los anticuerpos, Asn297 también puede localizarse algunos aminoácidos (habitualmente no más de 63 aminoácidos) cadena arriba o cadena abajo. Por ejemplo, en un anticuerpo según la invención, "Asn297" se encuentra situada en la posición aminoácida 298.

La glucosilación de la IgG1 ó IgG3 humana se produce en Asn297 en forma de glucosilación del complejo biantenarico

fucosilado terminado en hasta 2 residuos Gal (galactosa). Estas estructuras se denominan residuos glicano G0, G1 ($\alpha 1,6$ ó $\alpha 1,3$) o G2, dependiendo de la cantidad de residuos Gal terminales (Raju T.S., BioProcess Int. 1:44-53, 2003). La glucosilación de tipo CHO de las partes Fc de anticuerpos se describe en, por ejemplo, Routier F.H., Glycoconjugate J. 14:201-207, 1997.

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 β y las CDR pueden formar bucles que conecten la estructura de hojas β . Las CDR en cada cadena son mantenidas en su estructura tridimensional por las regiones de marco y forman conjuntamente con las CDR de la otra cadena, el sitio de unión a 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.

20 Las expresiones "región hipervariable" o "parte de unión de antígeno de un anticuerpo", tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a los residuos aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión de antígeno. La región hipervariable comprende residuos aminoácidos de las "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". 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 E.A. *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".

30 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 (RPS). La unión se refiere a la afinidad de unión (K_D) de 10^{-8} M o inferior, preferentemente de entre 10^{-13} y 10^{-9} M.

35 La unión a IGF-IR puede investigarse mediante un ensayo BIAcore (Pharmacia 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 muestran una K_D de 10^{-10} M o inferior.

40 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, la cantidad de IGF-I ó IGF-II marcados radioactivamente o fragmentos de unión de los mismos unida a IGF-IR proporcionado en la superficie de dichas células tumorales (por ejemplo HT29) se mide sin y con concentraciones crecientes del anticuerpo. Los valores de IC_{50} de los anticuerpos según la invención para la unión de IGF-I e IGF-II a IGF-IR no son superiores a 2 nM y la proporción de 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. Los valores de IC_{50} se miden como valores medios o de mediana de por lo menos tres mediciones independientes. Los valores de IC_{50} individuales pueden encontrarse fuera del alcance.

50 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 las células tumorales HT29 (ATCC nº HTB-38) en un ensayo *in vitro*. La inhibición se refiere a un valor de IC_{50} de 2 nM o inferior.

55 La expresión "células expresantes de IGF-IR" se refiere a las células que sobreexpresan receptor de IGF-I hasta aproximadamente por lo menos 20.000 receptores/célula. Dichas células son, por ejemplo, líneas celulares tumorales tales como NCI nº H322M o HT29, o una línea celular (por ejemplo 3T3 ATCC nº CRL1658) que sobreexpresa IGF-IR tras la transfección con un vector de expresión para IGF-IR. La cantidad de receptores por célula se mide según Lammers R. *et al.*, EMBO J. 8:1369-1375, 1989.

60 La expresión "inhibición de la fosforilación de IGF-IR" se refiere a un ensayo de fosforilación celular utilizando células 3T3 proporcionando 400.000 a 600.000 moléculas de IGF-IR por célula en un medio que contiene suero de feto bovino (FCS) al 0,5% inactivado por calor en comparación con dicho ensayo sin dicho anticuerpo. La fosforilación se

detecta mediante transferencia Western utilizando un anticuerpo específico para las proteínas fosforiladas con tirosina. Este tipo de ensayo se describe en el Ejemplo 11. La inactivación por calor del FCS se lleva a cabo mediante calentamiento corto a 56°C para la inactivación del sistema del complemento.

5 La expresión "inhibición de la fosforilación de PKB" se refiere a un ensayo de fosforilación celular utilizando células 3T3, que proporciona 400.000 a 600.000 moléculas de IGF-IR por célula en un medio que contiene suero de feto bovino (FCS) al 0,5% inactivado por calor en comparación con dicho ensayo sin dicho anticuerpo. La fosforilación se detecta mediante transferencia Western utilizando un anticuerpo específico para PKB fosforilado en la serina 473 de PKB (Akt 1, Swiss Prot nº de acceso P31749). Dicho ensayo se describe en el Ejemplo 11.

10 La expresión "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)" se refiere a la lisis de células tumorales diana humanas por parte de un anticuerpo según la invención en presencia de células efectoras. La ADCC se mide preferentemente mediante el tratamiento de una preparación de células expresantes de IGF-IR con un anticuerpo según la invención en presencia de células efectoras, tales como PBMC recién aisladas (células sanguíneas periféricas mononucleares) o células efectoras purificadas a partir de capas leucocitarias, por ejemplo monocitos o células NK (células asesinas naturales).

15 La expresión "inhibición completa de la transducción de señales mediada por IGF-I" se refiere a la inhibición de la fosforilación mediada por IGF-I de IGF-IR. Para dicho ensayo, las células expresantes de IGF-IR, preferentemente las células H322M, se estimulan con IGF-I y se tratan con un anticuerpo según la invención (una concentración de anticuerpo de 5 nM o superior resulta útil). A continuación, se lleva a cabo una SDS-PAGE y se mide la fosforilación de IGF-IR 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 que en el filtro de la transferencia Western no pueda detectarse visiblemente ninguna banda referida a IGF-IR fosforilado.

20 Los anticuerpos según la invención muestran preferentemente una unión al mismo epítipo de IGF-IR que el anticuerpo 18 ó resultan inhibidos en su unión a IGF-IR debido a impedimentos estéricos de unión al anticuerpo 18. La inhibición de la unión puede detectarse mediante un ensayo SPR utilizando anticuerpo 18 inmovilizado 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 18. Dicho ensayo puede llevarse a cabo de la misma manera mediante la utilización del anticuerpo 22 como anticuerpo inmovilizado.

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

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

35 Los anticuerpos según la invención preferentemente regulan negativamente el nivel de proteína IGF-IR en las células tumorales y en los tumores, por ejemplo en los tumores xenoinjertados.

40 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 NIH 3T3).

45 Los anticuerpos según la invención preferentemente no inhiben la unión de la insulina al receptor de insulina en un ensayo de unión competitiva sobre células 3T3 sobreexpresantes de receptor de insulina utilizando el anticuerpo a una concentración de 200 nmoles/l.

50 Los anticuerpos según la invención se producen por medios recombinantes en una célula CHO que fucosilan completamente el anticuerpo. Para la expresión de proteínas, se insertan ácidos nucleicos codificantes de cadenas ligeras y pesadas o fragmentos de los mismos en vectores de expresión mediante métodos estándares. La expresión se lleva a cabo en dichas células CHO, y el anticuerpo se recupera a partir de las mismas (del sobrenadante o de las células después de la lisis).

55 Puede producirse una célula huésped CHO útil mediante un método que comprende cultivar una célula CHO, transfectada con ácidos nucleicos codificantes de un anticuerpo según la invención, bajo presión selectiva de CHFR, recolectando clones individuales, expandiendo los clones y seleccionando un clon productor de un anticuerpo con el

patrón de glucosilación según la invención. Preferentemente el cultivo se lleva a cabo durante por lo menos dos semanas, preferentemente durante por lo menos tres semanas. La célula CHO preferentemente es una célula DG44.

5 La expresión "célula CHO" comprende las diversas formas de célula de ovario de hámster chino (CHO) basadas en dos alelos *dhfr* funcionalmente inactivos, preferentemente delecionados (deficientes en dihidrofolato reductasa (*dhfr*⁻)). Dichas células *dhfr*⁻ y los métodos para su generación se describen en, por ejemplo, Urlaub G. *et al.*, Cell 33:405-412, 1983; Chasin L. *et al.*, Som. Cell Molec. Genet. 12:555-556, 1986; Kolkekar A.S. *et al.*, Biochemistry 36:10901-10909, 1997. Preferentemente la célula es una línea de células DG44. Dichas células CHO *dhfr*⁻ pueden producirse
10 utilizando rayos gamma para eliminar el locus *dhfr* completo. En las células de tipo salvaje no mutadas, *dhfr* es un enzima esencial para la síntesis *de novo* de glicina, purinas y timidilato. Lo anterior permite que el gen *dhfr* codificado en un plásmido sea utilizado como marcador seleccionable dominante y como amplificador génico para la expresión de proteínas en líneas celulares deficientes en *dhfr*. La mutación *dhfr*⁻ en células DG44 es estable e irreversible. Las células CHO cotransfectadas con éxito con uno o más vectores de expresión para un anticuerpo de
15 tipo IgG1 ó IgG3 humano y el gen DHFR presentarán el genotipo *dhfr*⁺ y pueden ser fácilmente seleccionadas mediante cultivo de las colonias en un medio sin timidina e hipoxantina y que opcionalmente contenga metotrexato (MTX) para la amplificación.

20 Las células DG44 son bien conocidas del estado de la técnica y se encuentra, por ejemplo, disponibles comercialmente como líneas celulares, por ejemplo de Invitrogen Corp. (USA). Las células DG44 pueden crecer en forma adherente, en suspensión y/o en medio sin suero. En la presente memoria, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se utilizan intercambiamente y todas dichas denominaciones de líneas celulares CHO *dhfr*⁻ (dos alelos *dhfr* delecionados) incluyen la progenie. De esta manera, las expresiones "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeto primario y los cultivos derivados de la misma con independencia del
25 número de transferencias. También debe interpretarse que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en su contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o naturales. Se encuentra incluida la progenie variante que presenta las propiedades de glucosilación según la invención cribadas en la célula originalmente transformada.

30 Preferentemente, la línea celular CHO *dhfr*⁻ se coamplifica con por lo menos DHFR como un gen marcador seleccionable. Por ejemplo, se cotransfectan en células CHO receptoras un vector de expresión de mamífero que contiene el marcador o marcadores seleccionables y el gen de anticuerpo. Las colonias resultantes pueden seleccionarse y las colonias que muestren el fenotipo esperado son capaces de expresar el anticuerpo. Los marcadores seleccionables adicionales son de naturaleza dominante o pueden no serlo. Entre los ejemplos de marcadores seleccionables adicionales para la utilización en la cotransfección se incluyen la adenosina desaminasa (Kaufman R.J. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:3136-3140, 1986), la asparagina sintetasa (Cartier M. *et al.*, Mol. Cell Biol. 7:1623-1628, 1987), el gen *trpB* de *E. coli* y el gen *hisD* de *Salmonella* (Hartman S.C. y Mulligan R.C., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047-8051, 1988), la ribonucleótido reductasa M2 de ratón (Thelander M. y Thelander L., EMBO J. 8:2475-2479, 1989), el gen humano de resistencia a múltiples fármacos (Kane S.E. *et al.*, Gene 84:439-446, 1989), la glutamina sintetasa (Bebington C.R. *et al.*, DNA Cloning, vol. III, D.M. Glover (editor), IRL Press, páginas 163-188, 1987), la xantina-guanina fosforibosiltransferasa (*gpt*) (Mulligan R.C. y Berg P., Science 209:1422-1427, 1980), la higromicina B (Santerre R.F. *et al.*, Gene 30:147-156, 1984), el gen de la neomicina (Southern P.J. y Berg P., J. Mol. Appl. Genet. 1:327-341, 1982). Los marcadores seleccionables también pueden proporcionar la base sobre la que pueden amplificarse los genes codificantes del anticuerpo. En la cotransfección de una línea celular CHO, los ADN vectores con frecuencia se integran en el cromosoma de la célula en el mismo locus. De esta
40 manera, la utilización de únicamente uno de los marcadores seleccionables como base para la amplificación normalmente resulta en un incremento paralelo del número de copias de ambos genes. Un marcador seleccionable particular para la utilización de esta manera es *dhfr*, que permite realizar la amplificación deseada mediante la utilización de concentraciones crecientes de MTX (metotrexato). Un segundo marcador seleccionable preferente es GS, que permite la amplificación mediante la adición de metionina sulfoximina (MSX).
45

50 Los marcadores seleccionables evidentemente se encuentran bajo el control de elementos reguladores de ADN, de manera que se expresen. En el caso de que se utilice *dhfr* como marcador seleccionable, los elementos reguladores preferentemente son de origen vírico, tal como de virus tumorales ADN. Resultan particularmente preferentes la utilización de un promotor tardío mayor de SV40 ó de adenovirus. Resulta particularmente ventajoso a este respecto
55 eliminar el elemento intensificador del promotor, "paralizándolo" efectivamente de esta manera. Esta modificación permite niveles de amplificación génica a cada concentración de selección con metotrexato más altos de los que se requerirían si se utilizase un promotor fuerte. En el caso de que se utilice neomicina como marcador seleccionable, un ejemplo de un promotor adecuado es el promotor metalotioneína de ratón.

60 Los métodos generales para la producción recombinante de anticuerpos son bien conocidos del estado de la técnica y se describen, 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.

5 Los anticuerpos pueden encontrarse presentes en células completas, en el sobrenadante, 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, formación de bandas en CsCl, cromatografía de columna, electroforesis en gel de agarosa, y otras bien conocidas de la técnica (ver Ausubel F. *et al.*, editor, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987).

10 Entre las secuencias de control que resultan adecuadas para los procariontes 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.

15 Un ácido nucleico se encuentra "operablemente ligado" en el caso de que se encuentre situado 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 conectores según la práctica convencional.

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

35 La invención da a conocer además inmunoconjugados que comprenden el anticuerpo según la invención conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado) o un profármaco de un agente citotóxico. Los agentes que resultan útiles en la generación de dichos inmunoconjugados han sido indicados anteriormente. Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden utilizarse se incluyen la cadena A 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 α -sarcina, las proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas diantina, las proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, la curcina, la crocina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, la gelonina, la mitogelina, la restrictocina, la fenomicina, la enomicina y los tricotecenos.

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

60 En otro aspecto, la presente invención da a conocer una composición, por ejemplo una composición farmacéutica, que contiene un anticuerpo según la presente invención, formulado conjuntamente con un portador farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinadas

con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir una composición de la presente invención con por lo menos un agente antitumoral, tal como un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico o un profármaco u otra terapia convencional.

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

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

15 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 que el fármaco parental y que es capaz de ser enzimáticamente activado o convertido en la forma parental más activa. Ver, por ejemplo, Wilman D.E., *Biochemical Society Transactions* 14:375-382, 1986, y Stella V.J. *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", en: *Directed Drug Delivery*, Borchardt R.T. *et al.* (editores), páginas 247 a 267, Humana Press, Clifton, New Jersey, 1985. Entre los profármacos de la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los profármacos que contienen fosfato, los profármacos que contienen tiofosfato, los profármacos que contienen sulfato, los profármacos que contienen péptidos, los profármacos modificados con D-aminoácidos, los profármacos glucosilados, los profármacos de anillo β -lactamo, los profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o los profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros fármacos 5-fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco más activo sin efectos citotóxicos. 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 proporcionar 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 las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como las sales hidroclicóricas.

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

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

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

- 5 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.
- 10 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 dadas a conocer en la presente memoria, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por el experto en la materia.
- 15 Los niveles reales de las dosis de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas dadas a conocer en la presente memoria 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
- 20 utilizadas, la vía de administración, el momento de la administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se utiliza, la duración del tratamiento, otros fármacos, los compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares utilizadas, la edad, sexo, peso, condición, estado de salud general e historia médica del paciente bajo tratamiento, y factores similares bien conocidos de la técnica médica.
- 25 La composición debe ser estéril y líquida en grado suficiente para que la composición resulte administrable mediante jeringa. Además de agua, el portador preferentemente es una solución salina tamponada isotónica.
- 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
- 30 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.
- Preferentemente un anticuerpo completamente fucosilado según la invención resulta útil para el tratamiento del NSCLC (carcinoma pulmonar de células no pequeñas), preferentemente en combinación con erlotinib (Tarceva[®]),
- 35 para el tratamiento del cáncer de mama, preferentemente en combinación con Herceptin[®] (trastuzumab) y para los tumores pancreáticos, preferentemente en combinación con gemcitabina (Gemzar[®]).
- Los ejemplos, figura y listado de secuencias siguientes se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención.
- 40 Ejemplos
- Líneas celulares
- 45 La línea celular parental utilizada para la generación de una línea celular para la expresión recombinante de IgG es una línea de células de ovario de hámster chino (CHO), CHO-DG44 (Flintoff W.F. *et al.*, *Somat. Cell Genet.* 2:245-261, 1976; Flintoff *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 2:275-285, 1982; Urlaub G. *et al.*, *Cell* 33:405-412, 1983; Urlaub G. *et al.*, *Somat. Cell Mol. Genet.* 12:555-566, 1986). Las células CHO-DG44 han perdido ambos loci endógenos para el enzima dihidrofolato reductasa (DHFR).
- 50 Se cultivaron las células CHO-DG44 en medio MEM alfa Minus (Gibco n° 22561), FCS dializado al 10% (Gibco n° 26400-044) y L-glutamina 2 mmoles/l, hipoxantina 100 mM y timidina 16 mM (suplemento HT).
- Plásmidos
- 55 El sistema de expresión comprendía el promotor de CMV y se describe en la Tabla 1. Como anticuerpo se utilizó un anticuerpo contra IGF-1R (solicitud de patente WO n° 2005/005635, AK18 ó AK22).

Tabla 1

pb	Elemento vector/segmento de ADN
1-26	Sitios de restricción únicos: SgrAI, Sse8387I
27-614	Promotor de citomegalovirus humano (CMVH) (CMV-Prom), incluyendo el promotor IE del CMV,

ES 2 403 075 T3

615-641	que incluye la región 5'-UTR sintética
642-780	Conector
642-686	Secuencia líder de cadena pesada de Ig murina (L1, intrón de secuencia de señal, L2)
687-768	L1
769-780	Intrón de señal (intrón SS)
781-1105	L2
1106-1140	Dominio de cadena ligera κ del anticuerpo de IGF-1R (AK18)
1141-3134	Conector
2433-2913	Intrón 2 híbrido de cadena ligera κ humano/de ratón
3135-3475	Fragmento de intensificador κ
3476-3795	Conector
3796-4098	región constante de cadena ligera κ (C-kappa)
4099-4137	Secuencia de poliadenilación de cadena ligera κ de Ig humana (C-kappa pA)
4138-5800	Conector
4138-4485	Resistencia a la higromicina
4486-4502	Promotor de SV40 (SV40 Prom.), incluyendo repetición de 72 pb, TATA, origen de SV40
5403-5528	Conector
5529-5535	Higromicina-B-fosfotransferasa (Hyg)
5536-5795	Conector
5796-5800	Señal de poliadenilación de SV40 (SV40 pA)
5801-6944	Conector
5801-6088	Dihidrofolato reductasa murina (DHFR)
6089-6105	Promotor de SV40 (SV40 Prom.), incluyendo repetición de 72 pb acortada, origen de SV40
6106-6672	Conector
6673-6679	Gen DHFR murino (DHFR murino)
6680-6944	Conector
6945-7181	Señal de poliadenilación de SV40 (SV40 pA)
7182-8941	Conector
7182-7792	Origen de replicación bacteriano y marcador selectivo derivado del plásmido pUC18
7793-7939	Origen de replicación ("origen pUC")
7940-8847	Conector
8848-8941	Gen β -lactamasa (Ap(r))
8942-9529	Conector
9530-9556	Promotor de citomegalovirus humano (CMVH) (CMV-Prom), incluyendo el promotor IE del CMV, que incluye la región 5'-UTR sintética
9557-9696	Conector
9557-9602	Secuencia líder de cadena pesada de Ig murina (L1, intrón de secuencia de señal, L2)
9603-9685	L1
9686-9696	Intrón de señal (intrón SS)
9697-10051	L2
10052-10085	Dominio variable de cadena pesada de IgG1 del anticuerpo de IGF-IR (AK18)
10086-11682	Conector
11683-11909	Intrón híbrido 2 de cadena pesada humano/de ratón, incluyendo la parte de la región de segmento J de cadena pesada de Ig de ratón, incluyendo el elemento intensificador de cadena pesada de Ig (parte JH ₃ , JH ₄) Elemento intensificador de cadena pesada de Ig de ratón
11910-13504	Conector
11910-12203	Región constante de cadena pesada de IgG1 humana (CH1-bisagra-CH2-CH3)
12594-12638	CH1
12757-13086	Bisagra
13184-13504	CH2
13505-13967	CH3 (delección de sitio de procesamiento alternativo)
13968-13970	Secuencia de poliadenilación de cadena pesada de IgG1 humana (IgG1 pA)
	SgrAI-Conector

Ejemplo 1

Transfección y selección

5

Se llevó a cabo la transfección del plásmido de expresión con Fugene (Roche Diagnostics GmbH). Un día después de la transfección, las células DG44 se sometieron a presión selectiva consistente de medio MEM alfa Minus, FCS dializado al 10% y L-glutamina 2 mmoles/l y metotrexato (MTX) 20 nM. Tras 3 semanas bajo presión selectiva, se recolectaron clones individuales de la placa y se expandieron.

Se recogieron los sobrenadantes y se analizó la presencia del anticuerpo con un ensayo ELISA específico de IgG humana. Los subclones se expandieron adicionalmente y se analizaron para la producción de anticuerpos específicos.

Los clones se adaptaron al crecimiento en cultivo en suspensión y medio sin suero, HyQ SFM4 CHO-Utility (HyClone nº SH30516) que contenía MTX 20 nM. En paralelo, se determinó el perfil de glucosilación. Se seleccionaron los subclones que proporcionaban una defucosilación de 2,0% o inferior (referida a la cantidad molar total de oligosacáridos).

Ejemplo 2

Cultivo y purificación

Se cultivaron 3×10^5 células en matraces de agitación de 125 ml (Corning) llenos de 30 ml de medio a 37°C, 5% de CO₂, a 100 rpm durante 10 días. Se midió la densidad celular con el contador CASY y se recogió el sobrenadante para la determinación de la concentración de anticuerpo mediante cromatografía de afinidad de proteína A. Se purificaron aproximadamente 20 ml de cada sobrenadante para la caracterización bioquímica adicional mediante cromatografía con proteína A (equilibrado con PBS, lavado con tampón de citrato sódico 25 mM, pH 5,2, elución con tampón de citrato sódico 100 mM, pH 2,8, CIP con NaOH 10 mM).

Ejemplo 3

Análisis de la glucoestructura de los anticuerpos

Se analizó el material purificado de anticuerpos mediante análisis de mapa peptídico por cromatografía líquida/espectrometría de masas (CL-EM). Las muestras se redujeron (TRIS/HCl 0,4 M, Guanidina/HCl 8 M, pH 8,5, DTT (3 mg/ml), ácido yodoacético carboximetilado) y se cortaron con tripsina. Se separó la mezcla de péptido-glucopéptido mediante RP-HPLC y se analizó en línea mediante espectrometría de masas por electropulverización. Se integraron los espectros de m/z del péptido que contenía la glucoestructura; se proporcionan los resultados en la Tabla 2.

Tabla 2
Cantidad relativa de variantes de glucosilación

Clon nº	G0 [%]	G1 [%]	G2 [%]	No Fuc[%]	Man ¹ [%]
1	38,4	51,4	10,2	0,1	0,5
2	44,3	47,6	8,1	0,1	0,6
3	42,8	48,7	8,5	0,2	0,8
4	49,2	43,6	7,2	0,3	1,2
5	62,7	33,0	4,3	0,6	1,0
6	60,4	35,5	4,2	0,5	1,2
7	40,4	49,8	9,8	0,3	0,6
8	46,9	45,9	7,3	0,3	1,1

Man: Estructuras ricas en manosa que portan cuatro y cinco residuos de manosa, respectivamente.

G0, G1, G2: cadenas pesadas reducidas con complejo biantenarico fucosilado de tipo carbohidrato con 1, 2 ó 3 residuos de galactosa terminales. no Fuc: cadenas pesadas reducidas con complejo biantenarico de tipo carbohidrato sin fucosa.

La línea de células CHO clon nº 5 (MAB_hu<IGF-1R>B1-4E10_9-16) se depositó, bajo el Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes, en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Alemania, el 21 de junio de 2006, bajo el número de acceso DSM ACC 2795.

Los medios utilizados para el cultivo de los diferentes clones se obtuvieron de Hyclone (HyQ SFM4 CHO-Utility, utilizado para el clon 4-6) o de Sigma (C-8862 utilizado para los clones 1-3 y 7).

El análisis de mapa peptídico por CL/EM se llevó a cabo mediante integración de los cromatogramas iónicos específicos de todos los estados de carga de todos los glucopéptidos.

La GINAc bisectada, NGNA y compuestos ricos en manosa se determinaron de la misma manera.

La GINAc bisectada y NGNA no eran detectables. De esta manera, la cantidad de NGNA era de 0,5% o inferior, y también era de 0,1% o inferior. La cantidad de GlcNAc bisectada también era de 0,5% o inferior, y de 0,1 % o inferior.

En la Tabla 3 se muestra un cálculo ejemplar de glucosilación (Tabla 3a: clón 3, Tabla 3b: clón 5; péptido que comprende asn298, denominado H27).

10

Tabla 3a

	Área z=2	Área z=3	Área z=4	Suma	cant. rel. %
H27_G0	616	198	0	814	28,7
H27_G1	734	425	0	1158	40,9
H27_G2	103	135	0	238	8,4
H27_G3	0	0	0	0	0,0
H27_G4	0	0	0	0	0,0
H27_G1_1NGNA	0	0	0	0	0,0
H27_G2_1NGNA	0	0	0	0	0,0
H27_G2_2NGNA	0	0	0	0	0,0
H27_G3_1NGNA	0	0	0	0	0,0
H27_G3_2NGNA	0	0	0	0	0,0
G0 menos GlcNAc y menos Man	0	57	0	57	2,0
G0 menos GlcNAc	330	0	0	330	11,7
G1 menos GlcNAc	208	0	0	208	7,4
Man5	22	0	0	22	0,8
G0 menos Fuc	5	0	0	5	0,2
G1 menos Fuc	0	0	0	0	0,0
Man4	0	0	0	0	0,0
total				2833,15	100,00
cant. rel. de glucoestructuras con NGNA					0,0
cant. rel. de glucoestructuras con galactosas (G3 y G4)					0,0
cant. rel. de compuestos ricos en manosa					0,8
cant. rel. de G0 menos Fuc y G1 menos Fuc					0,2
Suma G0					42,4
Suma G1					48,2
Suma G2					8,4
Suma total					99,0
Respecto a 100% GO-1-2					
G0					42,8
	Área z=2	Área z=3	Área z=4	Suma	cant. rel. %
G1					48,7
G2					8,5
Suma sin Man					99,2
Suma G0/1 menos Fuc					0,2
Cantidad relativa sin Fuc					0,2

Área: área de pico

15 H27_G0 -H27_G4: Glucopéptido H27 (que contiene Asn298) con carbohidrato de tipo complejo biantenarico fucosilado con galactosa x-terminal (por ejemplo G4 con 4 unidades de galactosa)

Cantidad relativa sin Fuc: porcentaje de Fuc respecto al total de G0, G1 y G2 glucoestructura sin manosa (4 y 5) (ricas en manosa).

20 H27_G1_1NGNA -H27_G3_2NGNA: Glucopéptido H27 (que contiene Asn298) con carbohidrato de tipo complejo biantenarico fucosilado con unidades de galactosa x-terminales (por ejemplo G2 con 2 unidades) que porta uno a dos

ácidos N-glicolil-neuramínicos. Cantidad relativa sin Fuc: porcentaje de Fuc respecto al total de G0, G1 y G2 glucoestructura sin manosa (4 y 5) (ricas en manosa).

Tabla 3b

Cálculo ejemplar de glucosilación (clon 5)						
	Área z=2	Área z=3	Área z=4	Suma	cant. rel. [%]	
G0 ¹⁾	1108	318	0	1426	43,8	
G1 ¹⁾	579	319	0	897	27,6	
G2 ¹⁾	67	71	0	139	4,3	
G3 ¹⁾	0	0	0	0	0,0	
G4 ¹⁾	0	0	0	0	0,0	
G1_1NGNA ²⁾	0	0	0	0	0,0	
G2_1 NGNA ²⁾	0	0	0	0	0,0	
G2_2NGNA ²⁾	0	0	0	0	0,0	
G3_1NGNA ²⁾	0	0	0	0	0,0	
G3_2NGNA ²⁾	0	0	0	0	0,0	
G0-GlcNAc-Man ³⁾	0	95	0	95	2,9	
G0-GlcNAc ³⁾	485	0	0	485	14,9	
G1-GlcNAc ³⁾	159	0	0	159	4,9	
Man5 ⁴⁾	32	0	0	32	1,0	
G0-Fuc ⁵⁾	11	0	0	11	0,3	
G1-Fuc ⁵⁾	9	0	0	9	0,3	
Man4 ⁴⁾	0	0	0	0	0,0	
Total				3253,88	100,00	
G0						62,7
G1						33,0
Cálculo ejemplar de glucosilación (clon 5)						
	Área z=2	Área z=3	Área z=4	Suma	cant. rel. [%]	
G2						4,3
glucoestructuras sin fucosa						0,6
glucoestructuras que portan NGNA						0,0
Glucosilaciones que portan hexosas adicionales (G3+G4)						0,0
glucoestructuras ricas en manosa						1,0
¹⁾ glucoestructura de tipo complejo biantenarico fucosilado con galactosa x-terminal (0, 1, 2, 3 y 4, respectivamente) ²⁾ glucoestructura de tipo complejo biantenarico fucosilado con galactosa x-terminal (0, 1, 2, 3 y 4, respectivamente) con residuos adicionales de ácido n-glicolil-neuramínico ³⁾ glucoestructuras de tipo complejo biantenarico fucosilado (principalmente artefactos del método) ⁴⁾ estructuras ricas en manosa que portan cuatro o cinco residuos de manosa, respectivamente ⁵⁾ glucoestructuras no fucosiladas						

5

Ejemplo 4

Determinación de las funciones efectoras mediadas por anticuerpos utilizando anticuerpos MAb_hu anti-IGF-IR

- 10 Con el fin de determinar la capacidad de los anticuerpos MAb_hu generados de inducir mecanismos inmunológicos efectores, se llevaron a cabo estudios de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

15 Para estudiar los efectos de los anticuerpos en la ADCC, se marcaron células de cáncer de próstata DU-145 (HTB-81 ATCC, 1×10^6 en 2 a 4 ml de RPMI-FM) que expresaban IGF-IR, con 1 ml de solución de bis(acetoximetil)-2,2':6',2''-terpiridín-6,6''-dicboxilato (BATDA) durante 25 minutos a 37°C en un incubador celular. Las células se lavaron cuatro veces con 10 ml de RPMI-FM y se centrifugaron durante 10 minutos a 200xg con freno. A continuación, se ajustó la concentración de células a 1×10^5 células por ml. Se sembraron 5.000 células en cada pocillo de una placa de fondo redondo, correspondiendo a un volumen de 50 ml. Se añadieron anticuerpos MAb_hu a una concentración final comprendida entre 25 y 0,1 ng/ml en un volumen de 50 ml de medio de cultivo celular.

20 A continuación, se añadieron 50 ml de células efectoras, PBMC recién aisladas a partir de sangre completa o células efectoras purificadas procedentes de capas leucocitarias, a una proporción E: T del orden de 25:1. Las placas se

centrifugaron inmediatamente durante 1 minuto a 200xg con freno y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Tras la incubación, las células se pelletizaron durante 10 minutos a 200xg y 20 ml del sobrenadante se transfirieron a una placa de microtitulación Optiplate 96-F. Se añadieron 200 µl de solución de europio (a temperatura ambiente) y la mezcla se incubó durante 15 minutos en un agitador. La fluorescencia resultante se midió en un fluorímetro con resolución temporal utilizando el protocolo EU-TDA de Perkin Elmer.

La magnitud de la lisis celular por ADCC se expresa como % de la liberación máxima de TDA a partir de las células diana lisadas con detergente, corregida para la liberación espontánea de 2,2':6',2"-terpiridín-6,6"-dicarboxilato (TDA) a partir de las células diana respectivas. Como estándar de referencia de anticuerpo que mostraba "ADCC nula" se utilizó un anticuerpo (monoclonal) contra KLH (hemocianina de lapa americana) del mismo tipo de IgG o una mezcla de IgG aislada a partir de aproximadamente 35.000 donantes ("Redimune"). Se utilizó un anticuerpo libre de fucosa al 75% contra IGF-IR a modo de control positivo. Un anticuerpo según la invención mostraba una liberación de TDA dentro de 3xSD de la liberación de TDA del anticuerpo estándar (fig. 1).

Ejemplo 5

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

Instrumento: BIACORE® 3000
 Chip: CM5
 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 del chip para la presentación del anticuerpo contra IGF-IR. Se añadió el dominio extracelular de IGF-IR a diversas concentraciones en solución. Se midió la asociación mediante una inyección de IGF-IR de 3 minutos; se midió la disociación mediante lavado de la superficie del chip con tampón durante 5 minutos. Los datos de afinidad para los anticuerpos 18 y 22 se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

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

Ejemplo 6

Inhibición de IGF-I y unión de 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 péptidos ligando marcados radioactivamente.

Se sembraron en placa células tumorales humanas (HT29, NCI H322M, 0,5 a 1x10⁵/ml) en medio RPMI 1640 (PPA, nº de cat. E15-039) suplementadas 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 al 10% inactivado por calor (PAA, nº de cat. A15-771). En seis botellas de 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 CO₂ con el fin de obtener monocapas celulares confluyentes.

Para recoger células individuales, se añadieron 2 ml de 1x tripsina/EDTA (Gibco, nº de cat. 25300-054) por cada matraz T175 y se realizó un seguimiento del desprendimiento de las células utilizando un microscopio Zeiss Axiovert 25. Se recogieron las células y se añadió medio con FCS al 10% tal como se ha indicado anteriormente, hasta un volumen total de 50 ml. Se aislaron nuevamente las células mediante centrifugación durante 10 minutos a 1.000 rpm (*Heræus sepatech*, Omnifuge 2.0 RS) y se resuspendieron en 50 ml de tampón de unión (NaCl 120 mM, KCl 5 mM, MgSO₄ 1,2 mM, EDTA 1 mM, D(+)-glucosa 10 mM, NaAc 15 mM, Hepes 100 mM, pH 7,6, BSA al 1%). Se realizó un recuento de las células, se aislaron nuevamente mediante centrifugación y se ajustó con tampón de unión a 1x10⁶ células/ml.

Se diluyeron péptidos IGF-I e IGF-II marcados con I¹²⁵ (Amersham, ~2.000 Ci/mmol, nº de cat. IM172 e IM238), se solubilizaron en CH₃COOH al 0,1% y se diluyeron en tampón de unión hasta una actividad final de 4x10⁵ pulsos/(minuto x ml). Se añadieron 75 µl de anticuerpos a las concentraciones indicadas conjuntamente con 25 µl de péptido IGF-I ó IGF-II marcado con I¹²⁵ prediluido a 200 µl de suspensión celular y se incubaron durante 3,5

horas a 4°C. Se aislaron nuevamente las células mediante centrifugación durante 5 minutos a 2.000 rpm (Eppendorf, 5415C) y se eliminó el sobrenadante. Tras lavar dos veces en 1 ml de tampón de unión, las células se resuspendieron en 1 ml de tampón de unión y se transfirieron a tubos de centelleo. Se midió la cantidad de péptido radioactivo unido a los receptores de superficie celular en un contador de centelleo.

5 El valor medio de IC₅₀ para el anticuerpo 18 era de 0,3 nM. No pudo observarse inhibición detectable de la unión de IGF-II.

Ejemplo 7

10 Ensayo de competición de anticuerpos para la unión a IGF-IR.

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

20 Ejemplo 8

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

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

30 Se sembraron en placa células tumorales humanas (HT29, NCI H322M, 5 x10⁴/ml) en medio RPMI 1640 (PPA, n° de cat. E15-039) suplementadas con L-glutamina 2 mM, 1x aminoácidos no esenciales (Gibco, n° de cat. 11140-035), piruvato sódico 1 mM (Gibco, n° de cat. 11360-039) y FCS al 0,5% inactivado por calor (PAA, n° de cat. A15-771). Para la determinación de los valores de IC₅₀, se inocularon placas de 12 pocillos con 1 ml de células en el medio respectivo para cada experimento y se cultivaron durante dos días a 37°C y con 5% de CO₂.

35 Tras 48 horas de cultivo en medio pobre en suero, se retiró cuidadosamente el medio y se sustituyó por diferentes concentraciones de anticuerpos diluidos en el medio respectivo. Tras 5 minutos de incubación a 37°C y 5% de CO₂, 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 retiró el medio cuidadosamente 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, Na₄P₂O₇ 10 mM, inhibidor de proteasa Complete[®]). Se desengancharon las células utilizando un raspador celular (Corning, n° de cat. 3010) y el contenido de los pocillos se transfirió a tubos de reacción Eppendorf. Se eliminaron los fragmentos celulares mediante centrifugación durante 10 minutos a 13.000 rpm y a 4°C y se añadió la mitad del sobrenadante a 2x tampón para muestras 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 a 4°C) inmediatamente antes de añadir 1 ml de un anticuerpo policlonal contra IGF-IRβ (C-20, Santa Cruz Biotechnologies) o un anticuerpo monoclonal murino (IgG1) que reconoce un epítipo dentro de los aminoácidos 440 a 586 del dominio extracelular (cadena α) del receptor de tipo 1 del IGF humano (mAb 24-55, GroPep). 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[®] (Amersham Biosciences, n° 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[®]-X100 al 0,1%). Tras someter a ebullición las perlas en tampón para muestras Laemmli, se separaron las proteínas celulares mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN[®] BA 85, Schleicher & Schuell) mediante transferencia Western semiseca.

50 Se utilizó un anticuerpo específico de fosfotirosina (Upstate, clon 4G10, n° 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 (Cell Signalling, n° de cat. 9271).

60 Se encontró que el anticuerpo 18 podía inhibir IGF-1 mediante fosforilación de IGF-IR y PKB con una IC₅₀ de 0,6 nM.

Ejemplo 9

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

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

10 Se sembraron en placa células tumorales humanas (HT29, 5×10^4 /ml) en medio RPMI 1640 (PPA, nº de cat. E15-039) suplementadas 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 al 10% inactivado por calor (PAA, nº de cat. A15-771). Para cada periodo de incubación, se inoculó una placa de 12 pocillos con 1 ml de células en el medio respectivo para cada experimento y se cultivaron durante 24 horas a 37°C y con 5% de CO₂.

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

20 Se eliminó el medio cuidadosamente 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, Na₄P₂O₇ 10 mM, inhibidor de proteasa Complete[®]). Se desengancharon las células utilizando un raspador celular (Corning, nº de cat. 3010) y el contenido de los pocillos se transfirió a tubos de reacción Eppendorf. Se eliminaron los fragmentos celulares mediante centrifugación durante 10 minutos a 13.000 rpm y a 4°C y se añadió el sobrenadante a 2x tampón para muestras Laemmli en una proporción 1:1 (v/v). Se separaron las proteínas celulares mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN[®] BA 85, Schleicher % Schuell, nº de cat. 10 401196) mediante transferencia Western semiseca.

25 Se utilizó un anticuerpo específico para IGF-IR (C-20, Santa Cruz Biotechnologies, nº de cat. sc-713) para determinar los niveles de proteína de IGF-IR.

30 Se observó una regulación negativa de IGF-IR inducida por el anticuerpo de la invención pasadas menos de 24 horas desde la adición del anticuerpo.

Ejemplo 10

35 Inhibición de la unión de la insulina a células 3T3 expresantes del receptor de la insulina humana

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

45 Se sembraron en placa células 3T3 (1×10^5 /ml) que expresaban un número recombinantemente elevado ($>10^5$) de IR humano, en medio de Dulbecco MEM (DMEM) con alta concentración de glucosa (PAA, nº de cat. E15-009) suplementado con L-glutamina 2 mM (Gibco, nº de cat. 25030-025) y FCS al 10% inactivado por calor (PAA, nº de cat. A15-771). En seis botellas de 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 CO₂ con el fin de obtener monocapas celulares confluentes.

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

55 Se diluyó péptido insulina marcado con I¹²⁵ (Amersham, nº de cat. IM166, ~2.000 Ci/mmol), solubilizado en CH₃COOH al 0,1%, en tampón de unión hasta una actividad final de 4×10^5 pulsos/(minuto x ml). Se añadieron 75 ml de anticuerpo con 25 ml de péptido insulina marcado con I¹²⁵ prediluido a 200 ml de suspensión celular (concentración final de anticuerpo: 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 eliminó el sobrenadante. Tras lavar dos veces en 1 ml de tampón de unión, las células se resuspendieron en 1 ml de tampón de unión y se transfirieron a tubos de centelleo. Se midió la cantidad de péptido radioactivo unido a los receptores de superficie celular en un

60

contador de centelleo.

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

5

Ejemplo 11

Falta de estimulación de la fosforilación de IGF-R y Akt/PKB

10 Con el fin de excluir las actividades estimuladoras de IGF-IR del anticuerpo de la invención, se determinó la fosforilación de IGF-IR en ausencia de ligando IGF-I, aunque en presencia del anticuerpo de la invención y un anticuerpo de referencia (α IR3, Oncogene, Alemania). Lo anterior se llevó a cabo mediante un análisis de transferencia Western con anticuerpos específicos de estado de fosforilación. Se sembraron en placa células 3T3
 15 (ATCC nº CRL 1658) transfectadas con IGF-IR (5×10^4 células/ml, Pietrzkowski Z. *et al.*, Cell Growth Differ. 4:199-205, 1992) en medio de Dulbecco MEM (DMEM) con alta concentración de glucosa (PAA, nº de cat. E15-009) suplementado con L-glutamina 2 mM (Gibco, nº de cat. 25030-024) y FCS al 0,5% inactivado por calor (PAA, nº de cat. A15-771) o células tumorales humanas (HT29, NCI H322M, 5×10^4 /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 al 0,5% inactivado por calor (PAA, nº de cat. A15-771).
 20 Para la determinación de los valores de IC_{50} , 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_2 .

Tras 48 horas de cultivo en medio pobre en suero, se retiró cuidadosamente el medio y se sustituyó por diferentes
 25 concentraciones de anticuerpos diluidos en el medio respectivo. Las células se incubaron durante 15 minutos bajo las condiciones indicadas anteriormente. Se eliminó el medio cuidadosamente 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, $Na_4P_2O_7$ 10 mM, inhibidor de proteasa Complete™). Las células se desengancharon utilizando un raspador celular (Corning, nº de cat. 3010) y el contenido de los pocillos se transfirió a tubos de reacción Eppendorf. Se eliminaron los fragmentos celulares mediante centrifugación durante 10 minutos
 30 a 13.000 rpm y a 4°C (centrífuga Eppendorf 5415R) y se añadió la mitad del sobrenadante a 2x tampón para muestras Laemmli en una proporción 1:1 (v/v). Para la inmunoprecipitación del IGF-IR, el sobrenadante restante de los lisados celulares se sometió a una centrifugación clarificadora (10 minutos a 13.000 rpm y a 4°C) inmediatamente antes de la adición de 1 ml de un anticuerpo contra IGF-IR (C20, Santa Cruz Biotechnologies, nº de cat. sc-713 ó mAb 24-55, GroPep, nº de cat. MAD1). 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™ (Amersham Biosciences, nº de cat. 17-0618-01),
 35 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 X-100 al 0,1%). Tras someter a ebullición las perlas en tampón para muestras Laemmli, se separaron las proteínas celulares mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN BA 85, Schleicher & Schuell, nº de cat. 10 401196) mediante transferencia Western semiseca.
 40

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

Se observó que la Akt/PKB quinasa posteriormente en la ruta de señalización de IGF-IR era activada significativamente por el anticuerpo de referencia a concentraciones superiores a 5 nM, pero no por el anticuerpo de
 50 la invención a concentraciones de hasta 10.000 nM.

Ejemplo 12

Inducción de regulación negativa de receptores en modelos de xenoinjerto H322M

55 Se indujeron tumores en ratones desnudos y se trataron una vez con diferentes concentraciones del anticuerpo de la invención. Veinticuatro horas después del tratamiento se extrajeron los tumores y se homogeneizaron bajo nitrógeno líquido. Se añadió tampón de lisis frío (Hepes 50 mM, pH 7,2, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, glicerol al 10%, Triton X-100 al 1%, NaF 100 mM, Na_3VO_4 1 mM, $Na_4P_2O_7$ 10 mM, inhibidor de proteasa Complete™, PMSF 1 mM) en una
 60 proporción de volumen de tampón a peso de tumor de 3:1 y se mezclaron uniformemente con el homogenado tumoral en descongelación. 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 (centrífuga Eppendorf 5415R). Se

determinó la concentración de proteínas de las muestras con los reactivos Micro BRA™ (Pierce) y se añadió tampón de lisis para el ajuste a concentraciones iguales. Se añadió parte del sobrenadante a 2x tampón para muestras Laemmli en una proporción 1:1 (v/v). Se separaron las proteínas celulares mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN BA 85, Schleicher & Schuell, nº de cat. 10 401196) mediante transferencia Western semiseca. Se utilizó un anticuerpo específico para IGF-IR (C-20, Santa Cruz Biotechnologies, nº de cat. sc-713) para determinar IGF-IR.

Tras el tratamiento con el anticuerpo de la invención, se observó una reducción dependiente de la concentración de los niveles de IGF-IR, con una EC₅₀ estimada de 0,6 mg/kg.

Ejemplo 13

Inhibición del crecimiento de los tumores H322M

Se investigaron los efectos del anticuerpo 18 *in vivo* mediante la inducción de tumores en ratones desnudos atímicos según métodos establecidos. Se coinyectaron células H322M NSCLC humanas conjuntamente con Matrigel subcutáneamente en ratones nu (nu/nu) atímicos de 6-7 semanas de edad. Con este fin, se concentraron 5×10^6 células H322M en 100 ml de medio de cultivo y se mezclaron con 100 ml de Matrigel. Se inyectaron 200 µl de esta mezcla en los flancos derechos de los ratones. Se calculó el volumen tumoral mediante la medición de los diámetros de los tumores utilizando calibradores de Vernier dos veces a la semana según la fórmula publicada por primera vez por Geran *et al.* ("Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems", Cancer Chemother. Rep. 11.301, 1972), en la que volumen tumoral [mg] = (longitud x anchura)². Se administró anticuerpo intraperitonealmente (i.p.) a una dosis de 10 ml/kg. El tratamiento se inició con dosis duplicadas del anticuerpo administradas en volúmenes duplicados. Se indujeron tumores en ratones desnudos tal como se ha indicado anteriormente. Tras crecer los tumores hasta un volumen medio de 160 mg, los ratones se trataron intraperitonealmente seis veces una vez a la semana con 6, 0,6 y 0,06 mg/kg de anticuerpo como dosis consecutivas partiendo de 12, 1,2 y 0,12 mg/kg como dosis de carga administrada una vez el primer día del tratamiento. El experimento demostró que el bloqueo del eje IGF-IR por el anticuerpo mAb 18 anti-IGF-IR *rhu* resultaba en eficacia antitumoral al administrarse como agente único a una dosis de 6 y 0,6 mg/kg. En contraste, 0,06 mg/kg no presentó ningún efecto sobre el crecimiento tumoral.

Además, el anticuerpo 18 se sometió a ensayo en combinación con gemcitabina en el mismo modelo. Los tumores se indujeron tal como se ha indicado anteriormente y el tratamiento se inició tras haberse establecido los tumores y haber crecido hasta 170 mm³ de media en todos los grupos. Se administró anticuerpo una vez a la semana i.p. a dosis de 6 y 0,6 mg/kg y en combinación con 62 mg/kg de gemcitabina a una dosis de 0,6 mg. Se administró la gemcitabina durante un ciclo, es decir, cada tres días un total de cuatro veces. El tratamiento se inició mediante la administración de dosis duplicadas del anticuerpo. El experimento demostró que el tratamiento con anticuerpo 18 administrado una vez cada siete días inhibía el crecimiento tumoral por sí mismo y potenciaba la efectividad de la gemcitabina, un compuesto antimetabólico conocido.

Ejemplo 14

Inhibición del crecimiento de los tumores de 3T3

Se indujeron tumores en ratones desnudos esencialmente tal como se indica en el Ejemplo 15, excepto en que se utilizaron fibroblastos 3T3 murinos sobreexpresantes de IGF-IR humano. Se trataron ratones con tumores establecidos de aproximadamente 180 mg, intraperitonealmente una vez a la semana en siete ocasiones con 18, 6 ó 0,6 mg/kg de anticuerpo 18. El tratamiento se inició con dosis duplicadas de anticuerpo administradas como dosis de carga (36, 12 y 1,2 mg/kg). El experimento demostró que, mediante el tratamiento con el anticuerpo, el crecimiento tumoral puede retrasarse al administrarlo a dosis de 18 y 6 mg/kg una vez a la semana.

Ejemplo 15

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 células tumorales, se llevaron a cabo experimentos de curso temporal y posterior análisis de transferencia Western con anticuerpos específicos para IGF-IR.

Células tumorales humanas (HT29, 5×10^4 /ml) en medio RPMI 1640 (PPA, nº de cat. E15-039) suplementadas 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 al 10% inactivado por calor (PAA, nº de cat. A15-771). Para cada periodo de incubación, se

inoculó una placa de 12 pocillos con 1 ml de células en el medio respectivo para cada experimento y se cultivaron durante 24 horas a 37°C y con 5% de CO₂.

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

10 Se eliminó el medio cuidadosamente 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[®] X-100 al 1%, NaF 100 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM, inhibidor de proteasa Complete[®]). Se desengancharon las células utilizando un raspador celular (Corning, nº de cat. 3010) y el contenido de los pocillos se transfirió a tubos de reacción Eppendorf. Se eliminaron los fragmentos celulares mediante centrifugación durante 10 minutos a 13.000 rpm y a 4°C y se añadió el sobrenadante a 2x tampón para muestras Laemmli en una proporción 1:1 (v/v). Se separaron las proteínas celulares mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN[®] BA 85, Schleicher % Schuell, nº de cat. 10 401196) mediante transferencia Western semiseca.

20 Se utilizó un anticuerpo específico para IGF-IR (C-20, Santa Cruz Biotechnologies, nº de cat. sc-713) para determinar los niveles de proteína de IGF-IR.

Se observó una regulación negativa de 50% o superior de IGF-IR inducida por el anticuerpo de la invención pasadas 24 horas desde la adición del anticuerpo.

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> F. Hoffmann-La Roche

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

30 <130> 23707

<150> EP 06007571

<151> 2006-04-11

35 <150> EP 06016204

<151> 2006-08-03

<160> 8

40 <170> Patent In versión 3.2

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

45 <213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 403 075 T3

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Ser Val Ser Ser
115

<210> 2
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

10

ES 2 403 075 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3
 <211> 118
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

10

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 4
 <211> 108
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

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

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

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

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

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

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

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

10
 <210> 5
 <211> 990
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapiens

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

5

<400> 5

gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag	48
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys	
1 5 10 15	
agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac	96
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr	
20 25 30	
ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc	144
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser	
35 40 45	
ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc	192
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser	
50 55 60	
ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc	240
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr	
65 70 75 80	
tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag	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	
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> 6
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 6

```

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

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

```

10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 7

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

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

<210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 8

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

- 5 1. Anticuerpo ligante de receptor del factor I de crecimiento similar a la insulina (IGF-IR), caracterizado dicho anticuerpo porque es producido por medios recombinantes en una célula CHO que es la línea celular depositada DSM ACC2795.
2. Célula CHO capaz de expresar recombinantemente un anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizada porque es la línea celular depositada DSM ACC2795.

Fig. 1

