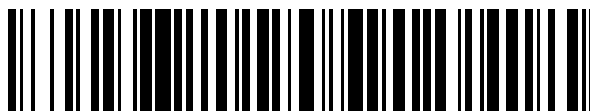


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 871**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2004** **E 04775941 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014** **EP 1622942**

54 Título: **Anticuerpos completamente humanos dirigidos contra el receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina humana**

30 Prioridad:

01.05.2003 US 467177 P

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

02.02.2015

73 Titular/es:

IMCLONE LLC (100.0%)
440 Route 22 East
Bridgewater, NJ 08807, US

72 Inventor/es:

LUDWIG, DALE, L.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 527 871 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 completamente humanos dirigidos contra el receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina humana.

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. 60/467.177 presentada el 1 de mayo de 2003.

Antecedentes

El receptor del factor de crecimiento de tipo insulina (IGF-IR) es un receptor tirosina cinasa transmembrana ubicuo que es esencial para que el crecimiento y el desarrollo fetal y posnatal sean normales. El IGF-IR puede estimular la proliferación celular, la diferenciación celular, cambios en el tamaño de la célula, y proteger a las células de la apoptosis. También se ha considerado casi obligatorio para la transformación celular (recapitulación en Adams et al., Cell. Mol. Life Sci. 57:1050-93 (2000); Baserga, Oncogene 19:5574-81 (2000)). El IGF-IR se localiza en la superficie celular de la mayoría de los tipos de células y sirve como molécula de señalización para los factores de crecimiento IGF-I e IGF-II (en conjunto denominados en el presente documento IGF). El IGF-IR también se une a la insulina, aunque con una afinidad tres órdenes de magnitud menores que con la que se une a IGF. El IGF-IR es un heterotetrámero preformado que contiene dos cadenas alfa y dos beta unidas covalentemente por puentes disulfuro. Las subunidades del receptor se sintetizan como parte de una cadena polipeptídica sencilla de 180 kd, que después se procesa proteolíticamente en las subunidades alfa (130 kd) y beta (95 kd). Toda la cadena alfa es extracelular y contiene el lugar de unión al ligando. La cadena beta procesa el dominio transmembrana, el dominio tirosina cinasa y una extensión en C-terminal que es necesaria para la diferenciación y la transformación celulares, pero es innecesaria para la señalización de mitógenos y la protección frente a la apoptosis.

El IGF-IR es muy similar al receptor de la insulina (IR), en particular dentro de la secuencia de la cadena beta (homología del 70 %). Debido a esta homología, en estudios recientes se ha demostrado que estos receptores pueden formar híbridos que contienen un dímero IR y un dímero IGF-IR (Pandini et al., Clin. Conc. Res. 5:1935-19 (1999)). La formación de híbridos se produce en células tanto normales como transformadas y el contenido en híbrido depende de la concentración de los dos receptores homodiméricos (IR e IGF-IR) dentro de la célula. En un estudio de 39 muestras de cáncer de mama, aunque tanto IR como IGF-IR estaban sobreexpresados en todas las muestras tumorales, el contenido en receptor híbrido superó de forma consistente los niveles de ambos homoreceptores aproximadamente 3 veces (Pandini et al., Clin. Canc. Res. 5:1935-44 (1999)). Aunque los receptores híbridos están compuestos por pares de IR e IGF-IR, los híbridos se unen de forma selectiva a los IGF, con una afinidad similar a la de IGF-IR, y solo se unen débilmente a la insulina ((Siddle y Soos, The IGF System. Humana Press. pp. 199-225. 1999). Por tanto, estos híbridos se pueden unir a los IGF y transducen las señales en células normales y transformadas.

Un segundo receptor de IGF, el IGF-IIR, o receptor de manosa-6-fosfato (M6P), también se une al ligando IGF-II con una afinidad elevada, pero carece de actividad tirosina cinasa (Oates et al., Breast Cancer Res. Treat. 47:269-81 (1998)). Debido a que da lugar a la degradación de IGF-II, se considera un sumidero para IGF-II, siendo un antagonista de los efectos estimulantes del crecimiento de este ligando. La pérdida de IGF-IIR en las células tumorales puede aumentar el potencial crecimiento mediante la liberación de su efecto antagonista sobre la unión de IGF-II con el IGF-R (Byrd et al., J. Biol. Chem. 274:24408-16 (1999)).

La expresión endocrina de IGF-I está regulada principalmente por hormonas de crecimiento y se produce en el hígado, pero pruebas recientes sugieren que muchos otros tipos de tejido también son capaces de expresar IGF-I. Por tanto, este ligando está sometido a regulación endocrina y paracrina, así como autocrina en el caso de muchos tipos de células tumorales (Yu, H. y Rohan, J., J. Natl. Cancer Inst. 92:1472-89 (2000)).

Se han identificado seis proteínas de unión a IGF (IGFBP) con afinidades de unión específica por los IGF en suero (Yu, H. y Rohan, J., J. Natl. Cancer Inst. 92:1472-89 (2000)). Los IGFBP pueden potenciar o inhibir la acción de los IGF, determinado por las estructuras moleculares de las proteínas de unión como resultado de las modificaciones postraduccionales. Sus papeles principales son el transporte de IGF, protección de IGF frente a la degradación proteolítica y la regulación de la interacción de los IGF con IGF-R. Solo aproximadamente el 1 % del IGF-I en suero está presente como ligando libre y el resto está asociado con IGFBP (Yu, H. y Rohan, J., J. Natl. Cancer Inst. 92:1472-89 (2000)).

Tras la unión del ligandos (IGF), el IGF-IR sufre autofosforilación en los residuos de tirosina conservados dentro del dominio catalítico de la cadena beta. La posterior fosforilación de los residuos de tirosina adicionales dentro de la cadena beta proporciona sitios de anclaje para el reclutamiento de las moléculas aguas abajo cruciales en la cascada de señalización. Las rutas principales de la transducción de la señal del IGF son proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) y fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) (revisado en Blakesley et al., En: The IGF System Humana Press 143-163 (1999)). La ruta del MAPK es principalmente responsable de la señal mitogénica provocada tras la estimulación de los IGF y la PI3K es responsable de la inducción dependiente de IGF de procesos antiapoptóticos o de supervivencia.

Un papel clave de la señalización de IGF-IR es su función antiapoptótica o de supervivencia. El IGF-IR activado

señala el PI3K y la fosforilación aguas debajo de Akt, o la proteína cinasa B. Akt puede bloquear con eficacia a través de fosforilación moléculas tales como BAD, que son esenciales para el inicio de la muerte celular programada, e inhibir el inicio de la apoptosis (Datta et al., *Cell* 91:231-41 (1997)). La apoptosis es un importante mecanismo celular que es crucial para los procesos de desarrollo normal (Oppenheim, *Annu. Rev. Neurosci.* 14:453-501 (1991)). Es un mecanismo clave para efectuar la eliminación de células muy dañadas y reducir la potencial persistencia de las lesiones mutagénicas que pueden estimular la tumorigénesis. Con este fin, se ha demostrado que la activación de la señalización de IGF puede estimular la formación de tumores espontáneos en un modelo de ratón transgénico (DiGiovanni et al., *Cancer Res.* 60:1561-70 (2000)). Adicionalmente, la sobreexpresión de IGF puede rescatar células de la muerte celular inducida por quimioterapia puede ser un importante factor en la resistencia a fármacos de células tumorales (Gooch et al., *Breast Cancer Res. Treat.* 56:1-10 (1999)). En consecuencia, se ha demostrado que la modulación de la vía de señalización del IGF aumenta la sensibilidad de las células tumorales a los agentes quimioterapéuticos (Benini et al., *Clinical Cancer Res.* 7:1790-97 (2001)).

En un gran número de estudios de investigación y clínicos se ha implicado al IGF-IR y sus ligandos (IGF) en el desarrollo, mantenimiento y progresión del cáncer. En las células tumorales, la sobreexpresión del receptor, a menudo junto con la sobreexpresión de ligandos de IGF, conduce a la potenciación de estas señales y, como resultado, a un aumento de la proliferación y supervivencia celular. Se ha demostrado que IGF-I and IGF-II son fuertes mitógenos para una amplia variedad de líneas de células cancerosas que incluyen cáncer de próstata (Nickerson et al., *Cancer Res.* 61:6276-80 (2001); Hellawell et al., *Cancer Res.* 62:2942-50 (2002)), de mama (Gooch et al., *Breast Cancer Res. Treat.* 56:1-10 (1999)), pulmonar, de colon (Hassan y Macaulay, *Ann. Oncol.* 13:349-56 (2002)), de estómago, leucemia, de páncreas, de cerebro, mieloma (Ge y Rudikoff, *Blood* 96:2856-61 (2000), melanoma (All-Ericsson et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43:1-8 (2002)), y de ovarios (revisado en: Macaulay, *Br. J. Cancer* 65:311-20 (1990)) y su efecto está mediado a través del IGF-IR. Niveles circulantes altos de IGF-I en suero se han asociado con un incremento del riesgo de cáncer de mama, de próstata y de colon (Pollak, *Eur. J. Cancer* 36:1224-28 (2000)). En un modelo de ratón de cáncer de colon, los incrementos de los niveles de IGF-I circulantes condujeron *in vivo* a un incremento significativo de la incidencia del crecimiento de los tumores y de metástasis Wu et al., *Cancer Res.* 62: 1030-35 (2002)). Se ha demostrado que la expresión constitutiva de IGF-1 en células basales epidérmicas de ratones transgénicos estimula la formación espontánea de tumores (DiGiovanni et al., *Cancer Res.* 60:1561-1570 (2000); Bol et al., *Oncogene* 14:1725-1734 (1997)). La sobreexpresión de IGF-II en las líneas celulares y tumores se produce con una frecuencia elevada y puede ser el resultado de la pérdida de impresión genómica del gen del IGF-II (Yaginuma et al., *Oncology* 54:502-7 (1997)). La sobreexpresión de receptores se ha demostrado en muchos tipos de tumores humanos, incluyendo de pulmón Quinn et al., *J. Biol. Chem.* 271:11477-83 (1996)), de mama (Cullen et al., *Cancer Res.* 50: 48-53 (1990); Peyrat y Bonnetterre, *Cancer Res.* 22:59-67 (1992); Lee y Yee, *Biomed. Pharmacother.* 49:415-21 (1995)), sarcoma (van Valen et al., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 118:269-75 (1992); Scotlandi et al., *Cancer Res.* 56:4570-74 (1996)), de próstata (Nickerson et al., *Cancer Res.* 61:6276-80 (2001)), y de colon (Hassan y Macaulay, *Ann. Oncol.* 13:349-56 (2002)). Además, se ha demostrado que las células cancerosas altamente metastásicas poseen una expresión más alta de IGF-II and IGF-IR que las células tumorales que son menos propensas a metastatizar (Guerra et al., *Int. J. Cancer* 65:812-20 (1996)). Un papel crucial del A IGF-IR en la proliferación y transformación celular se demostró en experimentos de fibroblastos de ratón con deficiencia en IGF-IR. Estas células primarias crecen a velocidades significativamente reducidas en el medio de cultivo con 10 % de suero y no transforman por diversos oncogenes, incluyendo SV40 Large T (Sell et al., *Mol. Cell. Biol.* 3604-12 (1994)). Recientemente se ha demostrado que la resistencia al fármaco herceptina en algunas formas de cáncer de mama puede deberse a la activación de la señalización de IGF-IR en dichos cánceres (Lu et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 93:1852-57 (2001)). La sobreexpresión o activación de IGF-IR puede no solo ser un determinante importante en la tumorigenicidad sino también en la resistencia a los fármacos en las células tumorales.

La activación del sistema IGF también se ha implicado en varias afecciones patológicas además del cáncer, incluida la acromegalia (Drange y Melmed. En: *The IGF System*. Humana Press. 699-720 (1999)), la neovascularización de la retina (Smith et al., *Nature Med.* 12:1390-95 (1999)), y la psoriasis (Wraight et al., *Nature Biotech.* 18:521-26 (2000)). En el último estudio, una preparación de oligonucleótidos antisentido dirigidos al IGF-IR fue eficaz en la inhibición significativa de la hiperproliferación de células epidérmicas en injertos de piel psoriásica humana en un modelo de ratón, lo que sugiere que las terapias anti-IGF-IR pueden ser un tratamiento eficaz para este trastorno crónico.

Se han desarrollado varias estrategias para inhibir la ruta de señalización de IGF-IR en las células. Los oligonucleótidos antisentido han sido eficaces en modelos de ratón *in vitro* y experimentales, como se ha mostrado anteriormente para la psoriasis. Además, se han generado péptidos inhibidores dirigidos a IGF-IR que poseen actividad antiproliferativa *in vitro* e *in vivo* (Pietrzkowski et al., *Cancer Res.* 52:6447-51 (1992); Haylor et al., *J. Am. Soc. Nephrol.* 11:2027-35 (2000)). Se ha demostrado que una secuencia peptídica sintética del extremo C del IGF-IR induce apoptosis e inhibe significativamente el crecimiento tumoral (Reiss et al., *J. Cell. Phys.* 181:124-35 (1999)). También se han generado varios mutantes negativos dominantes del IGF-IR que, tras la sobreexpresión en las líneas de células tumorales, compiten con el IGF-IR salvaje por el ligando e inhiben con eficacia el crecimiento de células tumorales *in vitro* e *in vivo* (Scotlandi et al., *Int. J. Cancer* 101:11-6 (2002); Seely et al., *BMC Cancer* 2:15 (2002)). Adicionalmente, también se ha demostrado que una forma soluble del IGF-IR inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* (D'Ambrosio et al., *Cancer Res.* 56:4013-20 (1996)). Asimismo, se ha demostrado que los anticuerpos

dirigidos contra el IGF-IR humano inhiben la proliferación de células tumorales *in vitro* y la tumorigénesis *in vivo*, incluyendo líneas celulares derivadas de cáncer de mama (Arteaga y Osborne, Cancer Res. 49:6237-41 (1989)), osteosarcoma de Ewing (Scotlandi et al., Cancer Res. 58:4127-31 (1998)), y melanoma (Furlanetto et al., Cancer Res. 53:2522-26 (1993)). Los anticuerpos son terapéuticas atractivas principalmente porque 1) pueden poseer una elevada selectividad por un antígeno proteico particular, 2) son capaces de exhibir una elevada afinidad de unión al antígeno, 3) poseen semividas prolongadas *in vivo* y, dado que son productos inmunitarios naturales, deben 4) exhibir una toxicidad *in vivo* baja (Park y Smolen. En: Advances in Protein Chemistry. Academic Press. pp:360-421 (2001)). Los anticuerpos derivados de fuentes no humanas, por ejemplo, de ratón, pueden efectuar una respuesta inmunológica dirigida contra el anticuerpo terapéutico, tras repetidas aplicaciones, de modo que se neutraliza la eficacia del anticuerpo. Los anticuerpos completamente humanos ofrecen el mayor potencial de éxito como terapéuticas humanas ya que probablemente serían menos inmunogénicos que los anticuerpos murinos o quiméricos en seres humanos, de un modo similar a los anticuerpos inmunorespondedores de origen natural. El documento WO 02/053596 divulga anticuerpos y proteínas de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente al receptor del factor I de crecimiento similar a la insulina (IGF-IR). Existe la necesidad de desarrollar anticuerpos monoclonales humanos anti-IGF-IR para uso terapéutico.

Sumario de la invención

La invención proporciona anticuerpos humanos aislados y fragmentos de los mismos que se unen específicamente al receptor de IGF-I humano. De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, los anticuerpos tienen al menos una propiedad seleccionada de (i) inhibe la unión de IGF-I o IGF-II a IGF-IR, (ii) neutraliza la activación de IGF-IR por IGF-I o IGF-II, (iii) reduce el receptor de superficie de IGF-IR en al menos un 80 %; y (iv) se une a IGF-IR con una K_d de aproximadamente 3×10^{-10} M o menos y tiene una cadena pesada que comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que tienen una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 14 en V_H CDR1, la SEC ID N° 6 en V_H CDR2 y la SEC ID N° 18 en V_H CDR3; y una cadena ligera que comprende CDR que tienen una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 26 en V_L CDR1, la SEC ID N° 28 en V_L CDR2 y la SEC ID N° 30 en V_L CDR3.

Preferentemente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención tiene una región variable en la cadena pesada de SEC ID N° 2 y una región variable en la cadena ligera de la SEC ID N° 10.

Más preferentemente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención tiene todas las propiedades indicadas anteriormente.

En una realización más preferida, un anticuerpo de la invención reduce el receptor de la superficie de IGF-IR en al menos un 85 % y, más preferentemente, en al menos un 90 %.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención se une preferentemente a IGF-IR con una K_d de aproximadamente 5×10^{-11} M o inferior.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención inhibe preferentemente la fosforilación de un sustrato aguas debajo de IGF-IR. El sustrato aguas abajo se puede seleccionar de MAPK, Akt y IRS-2. La fosforilación se inhibe en aproximadamente un 50 % o más.

Preferentemente, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención estimula la regresión tumoral *in vivo*, y, en particular, cuando se administra con un agente antineoplásico.

El dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo de acuerdo con la presente invención tiene, preferentemente, una homología de secuencia de al menos un 90 % con la SEC ID N° 2.

El dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo de acuerdo con la presente invención tiene, preferentemente, una homología de secuencia de al menos un 90 % con la SEC ID N° 10.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención se proporciona un conjugado que comprende el a composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención unido a un agente citotóxico o un marcador.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la presente invención se proporciona una composición terapéutica eficaz para inhibir el crecimiento de células tumorales humanas que expresan IGF-IR y estimular la regresión de los tumores que expresan IGF-IR, en la que la composición comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención.

La composición terapéutica puede además comprender un agente antineoplásico. El agente antineoplásico puede ser un inhibidor de la topoisomerasa I o la topoisomerasa II. Preferentemente, el agente antineoplásico se selecciona de irinotecán, camptotecán y etopósido.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la presente invención para su uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo.

El trastorno proliferativo se puede seleccionar de acromegalia, neovascularización de la retina y psoriasis.

5 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento *in vitro* de inhibición del crecimiento de una célula que expresa IGF-IR, que comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención. El procedimiento puede además comprender poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un agente antineoplásico. A este respecto, el agente antineoplásico es un inhibidor de la topoisomerasa I o la topoisomerasa II y se puede seleccionar de irinotecán, camptotecán y etopósido.

10 De acuerdo con un séptimo aspecto de la presente invención se proporciona un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención para su uso en la reducción y/o prevención del crecimiento tumoral o la estimulación de la regresión tumoral.

Preferentemente, el uso comprende además administrar una cantidad eficaz de un agente antineoplásico.

15 El agente antineoplásico es, preferentemente, un inhibidor de la topoisomerasa I o la topoisomerasa II y se selecciona de irinotecán, camptotecán y etopósido.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la presente invención se usa preferentemente para reducir o prevenir el crecimiento tumoral en el que el tumor es un tumor de mama, tumor colorrectal, tumor de páncreas, tumor de ovario, tumor de pulmón, tumor de próstata, hueso o sarcoma de tejidos blandos o mieloma.

20 De acuerdo con un aspecto adicional más de la presente invención se proporciona un inhibidor de la topoisomerasa I o la topoisomerasa II para su uso en la reducción o prevención del crecimiento de un tumor que expresa IGF-IR o estimulación de la regresión de un tumor que expresa IGF-IR en combinación con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente al IGF-IR y tiene al menos una propiedad seleccionada de:

(i) inhibe la unión de IGF-I o IGF-II a IGF-IR;

(ii) neutraliza la activación de IGF-IR por el IGF-I o IGF-II;

25 (iii) reduce el receptor de la superficie IGF-IR en al menos un 80 %; y

(iv) se une al IGF-IR con una K_d de aproximadamente 3×10^{-10} M o menos;

y tiene una cadena pesada que comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que tienen una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 14 en V_H CDR1, SEC ID N° 16 en V_H CDR2, y SEC ID N° 18 en V_H CDR3;

30 y una cadena ligera que comprende CDR que tienen una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 26 en V_L CDR1, SEC ID N° 28 en V_L CDR2, y SEC ID N° 30 en V_L CDR3.

Preferentemente, el inhibidor de la topoisomerasa I o la topoisomerasa II se selecciona de irinotecán, camptotecán y etopósido.

35 El inhibidor de la topoisomerasa I o la topoisomerasa II de la presente invención se usa preferentemente para reducir o prevenir el crecimiento tumoral en el que el tumor es un tumor de mama, tumor colorrectal, tumor de páncreas, tumor de ovario, tumor de pulmón, tumor de próstata, hueso o sarcoma de tejidos blandos o mieloma.

Los anticuerpos de la invención usados solos o en combinación con un agente antineoplásico son útiles para tratar enfermedades neoplásicas y trastornos hiperproliferativos.

La invención proporciona polinucleótidos que codifican los anticuerpos o fragmentos de los mismos, vectores de expresión que comprenden las secuencias polinucleotídicas y células huésped para su expresión.

40 Adicionalmente, la invención proporciona composiciones farmacéuticas y procedimientos de diagnóstico y terapéuticos para el tratamiento de tumores y enfermedades hiperproliferativas. Los procedimientos pueden comprender además la administración de un agente o tratamiento anti-neoplásico.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa la secuencia de nucleótidos del dominio variable de la cadena pesada 2F8.

45 La Figura 2 representa la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada 2F8. Las CDR están en negrita y subrayadas.

La Figura 3 representa la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada 2F8 completa (subrayado: secuencia

señal secretora; cursiva: región constante de IgG1).

La Figura 4 representa la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada 2F8 completa (subrayado: secuencia señal secretora; negrita: CDR; cursiva: región constante de IgG1).

La Figura 5 representa la secuencia de nucleótidos del dominio variable de la cadena ligera 2F8.

5 La Figura 6 representa la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera 2F8. Las CDR están en negrita y subrayadas.

La Figura 7 representa la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera 2F8 completa (subrayado: secuencia señal secretora; cursiva: región constante de IgG1).

10 La Figura 8 representa la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera 2F8 completa (subrayado: secuencia señal secretora; negrita: CDR; cursiva: región constante de IgG1).

La Figura 9 representa la secuencia de nucleótidos del dominio variable de la cadena ligera A12.

La Figura 10 representa la secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera A12. Las CDR están en negrita y subrayadas.

15 La Figura 11 representa la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera A12 completa (subrayado: secuencia señal secretora; cursiva: región constante de IgG1).

La Figura 12 representa la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera A12 completa (subrayado: secuencia señal secretora; negrita: CDR; cursiva: región constante de IgG1).

La Figura 13 representa las secuencias de CDR de V_H and V_L de los anticuerpos 2F8 y A12. Las diferencias entre las CDR de V_L están subrayadas.

20 La Figura 14 representa la homología entre las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 2F8 y A12. Las diferencias de las secuencias están en recuadros y las CDR están subrayadas.

La Figura 15 muestra los resultados de un ensayo que mide la capacidad de los anticuerpos 2F8 y A12 para bloquear la unión de IGF-I a al IGF-IR soluble inmovilizado. Se analizaron los anticuerpos A12 que tienen regiones constantes en la cadena ligera kappa o lambda.

25 La Figura 16 muestra los resultados de un ensayo que mide la capacidad de los anticuerpos 2F8 y A12 (cadena ligera lambda) para bloquear la unión de IGF-I a las células MCF7.

La Figura 17 muestra los resultados de un ensayo que mide la capacidad de los anticuerpos 2F8 y A12 para bloquear la unión de la insulina a las células ZR75-I.

30 La Figura 18 muestra el efecto del anticuerpo sobre A12 sobre la incorporación de 3H -timidina en un ensayo de mitogénesis. Figura 18A: células de cáncer de mama MCF7; Figura 18B: células de cáncer de páncreas BxPC-3; Figura 18C: células de cáncer de colon HT-29.

La Figura 19 muestra la inhibición de la fosforilación del receptor mediada por IGF-I. Panel A: Inhibición en células de cáncer de mama MCF7 por los anticuerpos A12 y 2F8. Panel B: Inhibición en células HT-29 de cáncer colorrectal y células de cáncer de páncreas BxPC-3 por el anticuerpo A12.

35 La Figura 20 muestra la inhibición de la fosforilación mediada por IGF-I de las moléculas efectoras aguas abajo por los anticuerpos A12 y 2F8. Panel A: Inhibición de la fosforilación de MAPK; Panel B: Inhibición de la fosforilación de Akt.

40 La Figura 21 muestra la unión de anticuerpo A12 a líneas celulares positivas y negativas para IGF-IR humano y murino. MCF7: células de cáncer de mama humano; R-: fibroblastos de embrión de ratón; HEL: células de leucemia humana; pulmón de Lewis: células de carcinoma de pulmón de ratón.

La figura 22 muestra la internalización del receptor- El panel A muestra la internalización del anticuerpo A12 marcado después de la unión a IGF-IR en las células MCF7. El panel B muestra el agotamiento de la superficie celular asociada IGF-IR. El panel C muestra la degradación del IGF-IR celular total después del tratamiento prolongado con A12.

45 La Figura 23 muestra la inhibición del crecimiento del carcinoma de colon humano HT-29 en ratones atímicos por el anticuerpo y CPT-11 (irinotecán) de forma individual o en combinación.

La Figura 24 muestra el efecto del anticuerpo sobre A12 el crecimiento del tumor colorrectal humano HT-29 en ratones atímicos.

La Figura 25 muestra el efecto del anticuerpo sobre A12 el crecimiento de cáncer de mama humano MCF7 en

ratones atímicos.

La Figura 26 muestra la inhibición de xenoinjertos de cáncer de páncreas BxPC-3 en ratones atímicos por el anticuerpo A12, gemcitabina o CPT-11 (irinotecán) de forma individual o en combinación.

5 La Figura 27 muestra la inhibición de xenoinjertos de cáncer colorrectal HT-29 en ratones atímicos por el anticuerpo A12, paclitaxel o CPT-11 (irinotecán) de forma individual o en combinación.

Descripción detallada de la invención

10 La presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de los mismos específicos para receptor del factor de crecimiento de tipo insulina (IGF-IR), así como secuencias de polinucleótidos aislados o purificados que codifican los anticuerpos. En ciertas realizaciones de la invención, se proporcionan anticuerpos humanos. Los anticuerpos también se pueden utilizar en combinación con otros agentes químicos y biológicos, incluyendo, entre otros, agentes antineoplásicos y/o agentes que son inhibidores de otros receptores o sustratos de receptores que median en el crecimiento celular. La invención se refiere además a agentes antineoplásicos que son inhibidores de la función de la topoisomerasa. La elección de tales agentes es ventajosa para su uso en procedimientos terapéuticos en combinación con anticuerpos que son específicos para IGF-IR.

15 Los anticuerpos de la presente invención son, preferentemente, humanos y se pueden usar para tratar enfermedades neoplásicas, incluidos tumores sólidos y no sólidos, y para el tratamiento de trastornos hiperproliferativos. Las cadenas individuales pueden plegarse en dominios que tienen tamaños (110-125 aminoácidos) y estructuras similares, pero diferentes funciones. La cadena ligera puede comprender un dominio variable (V_L) y/o un dominio constante (C_L). La cadena pesada puede también comprender un dominio variable (V_H) y/o, en función de la clase o el isotipo de anticuerpo, tres o cuatro dominios constantes (C_H1 , C_H2 , C_H3 y C_H4). En seres humanos, los isotipos son IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y la IgA y la IgG además se dividen en subclases o subtipos (IgA₁₋₂ e IgG₁₋₄).

20 En general, los dominios variables muestran una considerable variabilidad de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo al otro, en particular en la localización del sitio de unión al antígeno. Tres regiones, denominadas regiones hipervariables o determinantes de la complementariedad (CDR), se encuentran en cada V_L y V_H , soportadas por regiones menos variables denominadas regiones marco.

25 La porción de un anticuerpo constituida por los dominios V_L y V_H se denomina Fv (fragmento variable) y constituye el sitio de unión al antígeno. La Fv de una cadena (scFv) es un fragmento de anticuerpo que contiene un dominio V_L y un dominio V_H en una cadena polipeptídica, en la que el extremo N de un dominio y el extremo C del otro dominio están unidos por un enlazador flexible (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 4.946.778 (Ladner y col.); el documento WO 88/09344, (Huston y col.). El documento WO 92/01047 (McCafferty y col.) describe la expresión de los fragmentos scFv sobre la superficie de paquetes de expresión genética recombinantes solubles, tales como bacteriófagos.

30 Los enlazadores peptídicos usados para producir los anticuerpos de cadena sencilla pueden ser péptidos flexibles seleccionados para garantizar que se produce el plegamiento tridimensional adecuado y la asociación de los dominios de V_L y V_H . En general, el enlazador tiene de 10 a 50 residuos de aminoácidos. Preferentemente, el enlazador tiene de 10 a 30 residuos aminoácidos. Más preferentemente, el enlazador tiene de 12 a 30 residuos aminoácidos. Un ejemplo no limitante de dichos péptidos enlazadores incluye (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ (SEC ID N° 33).

35 Fab (Fragmento de unión a antígeno) se refiere a los fragmentos del anticuerpo que consisten en los dominios V_L - C_L y V_H - C_H1 . Tal fragmento generado por la digestión de un anticuerpo entero con papaína no conserva la región bisagra del anticuerpo a través de la cual normalmente están unidas dos cadenas pesadas. El fragmento es monovalente y simplemente se denomina Fab. Alternativamente, la digestión con pepsina da como resultado un fragmento que conserva la región bisagra. Tal fragmento con enlaces disulfuro intercatenarios intactos que unen dos cadenas pesadas es divalente y se conoce como F(ab')₂. Un Fab' monovalente se produce cuando los enlaces disulfuro de un fragmento F(ab')₂ se reducen (y las cadenas pesadas se separan). Debido a que son divalentes, los anticuerpos intactos y los fragmentos F(ab')₂ tienen una mayor avidéz por el antígeno que el los fragmentos Fab o Fab' monovalentes. El documento WO 92/01047 (McCafferty y col.) describe la expresión de los fragmentos Fab sobre la superficie de paquetes de expresión genética recombinantes solubles, tales como bacteriófagos.

40 El Fc (fragmento de cristalización) es la designación de la porción o fragmento de un anticuerpo que consiste en los dominios constantes de la cadena pesada emparejados. En un anticuerpo IgG, por ejemplo, el Fc consiste en los dominios C_H2 and C_H3 de la cadena pesada. El Fc de un anticuerpo IgA o IgM comprende además un dominio C_H4 . El Fc está asociado con la unión al receptor de Fc, la activación de la citotoxicidad mediada por complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Para anticuerpos tales como IgA e IgM, que son complejos de múltiples proteínas similares a IgG, la formación de complejos requiere los dominios constantes de Fc.

55 Por último, la región bisagra separa las porciones Fab y Fc del anticuerpo, lo que proporciona movilidad de los Fab uno respecto de otro y respecto al Fc, además de incluir múltiples puentes disulfuro para el enlace covalente de las

dos cadenas pesadas.

Se han desarrollado formatos de anticuerpos que conservan especificidad de unión, pero que tienen otras características que pueden ser deseables, incluso para ejemplo, biespecificidad, multivalencia (más de dos sitios de unión), tamaño compacto (por ejemplo, dominios de unión solos).

- 5 Los anticuerpos de cadena sencilla carecen de parte o de todos los dominios constantes de todos los anticuerpos a partir de los cuales derivan. Por tanto, se pueden superar algunos de los problemas asociados con el uso de anticuerpos enteros. Por ejemplo, los anticuerpos de cadena sencilla tienen a carecer de determinadas interacciones indeseadas entre las regiones constantes de las cadenas pesadas y otras moléculas biológicas. Adicionalmente, los anticuerpos de cadena sencilla son considerablemente más pequeños que los anticuerpos enteros y pueden tener una permeabilidad mayor que los anticuerpos enteros, lo que permite que los anticuerpos de cadena sencilla se localicen y se unan a los sitios de unión al antígeno diana con mayor eficacia. Además, el tamaño relativamente pequeña de los anticuerpos de cadena sencilla hace que sea menos probable que provoquen en un receptor una respuesta inmunitaria indeseada que los anticuerpos enteros.

- 15 Los anticuerpos de múltiples cadenas en los que cada cadena tiene un dominio V_H y uno V_L unidos covalentemente por un primer enlazador peptídico pueden estar unidos covalentemente por al menos uno o más enlazadores peptídicos para formar anticuerpos de una cadena multivalentes, que pueden ser monoespecíficos o multiespecíficos. Cada cadena de un anticuerpo de una cadena multivalente incluye un fragmento de la región variable de la cadena ligera y un fragmento de la región variable de la cadena pesada, y está unido por un enlazador peptídico a al menos otra cadena. El enlazador peptídico está compuesto por al menos quince residuos de aminoácidos. El número máximo de residuos de aminoácidos es de aproximadamente cien.

- 25 Dos anticuerpos de cadena sencilla se pueden combinar para formar un diacuerpo, también conocido como dímero bivalente. Los diacuerpos tienen dos cadenas y dos sitios de unión, y pueden ser monoespecíficos o biespecíficos. Cada cadena del diacuerpo incluye un dominio V_H conectado a un dominio V_L . Los dominios están conectados con enlazadores lo bastante cortos para prevenir el emparejamiento entre los dominios en la misma cadena, de modo que se fuerza el emparejamiento a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno.

- 30 Tres anticuerpos de cadena sencilla se pueden combinar para formar triacuerpos, también conocidos como trímeros trivalentes. Los triacuerpos se construyen con el extremo aminoácido de un dominio V_L o V_H directamente condensado al extremo carboxilo de un dominio V_L o V_H , es decir sin ninguna secuencia enlazadora. El triacuerpo tiene tres cabezas F_v con los polipéptidos dispuestos de un modo cíclico y de cabeza a cola. Una conformación posible del triacuerpo es planar con los tres sitios de unión localizados en un plano en un ángulo de 120 grados uno de otro. Los triacuerpos pueden ser monoespecíficos, biespecíficos o trispecíficos.

- 35 Por tanto, los anticuerpos de la invención y fragmentos de los mismos incluyen, entre otros, anticuerpos de origen natural, fragmentos bivalentes tales como $(Fab')_2$, fragmentos monovalentes tales como Fab , anticuerpos de una cadena, F_v de una cadena ($scFv$), anticuerpos de un solo dominio, anticuerpos multivalentes de una cadena, diacuerpos, triacuerpos y similares, que se unen específicamente a los antígenos.

- 40 Los anticuerpos de la presente invención, y particularmente los dominios variables de los mismos, pueden obtenerse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, el procedimiento inmunológico descrito por Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495-497 (1975) y Campbell, *Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas*, Burdon et al., Eds., Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Volume 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1985); así como por los procedimientos de ADN recombinante tal como el descrito por Huse et al., *Science*, 246, 1275-81 (1989). Los anticuerpos también se pueden obtener a partir de bibliotecas de expresión en fagos que llevan combinaciones de los dominios V_H y V_L dominios en forma de $scFv$ o Fab . Los dominios V_H y V_L pueden estar codificados por nucleótidos que son sintéticos, parcialmente sintéticos o de origen natural. En ciertas realizaciones se pueden preferir las bibliotecas de expresión en fagos que llevan fragmentos de anticuerpos humanos. Otras fuentes de anticuerpos humanos son ratones transgénicos modificados genéticamente para expresar genes de inmunoglobulina humana.

- 50 Los fragmentos de anticuerpo se pueden producir escindiendo un anticuerpo entero o expresando ADN que codifica el fragmento. Los fragmentos de anticuerpos se pueden preparar mediante procedimientos descritos por Lamoyi y col., *J. Immunol. Methods*, 56: 235-243 (1983) y por Parham, *J. Immunol.* 131: 2895-2902 (1983). Dichos fragmentos pueden contener uno o ambos fragmentos Fab o el fragmento $F(ab')_2$. Dichos fragmentos pueden también contener anticuerpos con la región variable del fragmento de una cadena, es decir $scFv$, diacuerpos u otros fragmentos de anticuerpo. Los procedimientos de producir dichos equivalentes funcionales se divulgan en la solicitud de PCT WO 93/21319, la solicitud de patente europea nº EP 239.400; la solicitud de PCT WO 89/09622; la solicitud de patente europea 338.745; y la solicitud de patente europea EP 332.424.

Los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, de la presente invención son específicos para IGF-IR. La especificidad del anticuerpo se refiere al reconocimiento selectivo del anticuerpo para un epítipo particular de un antígeno. Los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, de la presente invención pueden ser por ejemplo,

monoespecíficos o biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos (BsAb) son anticuerpos que tienen dos especificidades o sitios de unión a antígeno diferentes. Cuando un anticuerpo tiene más de una especificidad, los epítomos reconocidos se pueden asociar con un solo antígeno o con más de un antígeno. Por tanto, la presente invención proporciona anticuerpos biespecíficos, o fragmentos de los mismos, que se unen a dos antígenos diferentes, con al menos una especificidad por IGF-IR.

La especificidad de los presentes anticuerpos, o fragmentos de los mismos, por el IGF-IR se puede determinar en base a la afinidad y/o la avidez. La afinidad, representada por la constante de equilibrio, por la disociación de un antígeno con un anticuerpo (Kd), mide la fuerza de la unión entre un determinante antigénico y un sitio de unión al anticuerpo. La avidez es la medida de la fuerza de la unión entre un anticuerpo y su antígeno. La avidez está relacionada con la afinidad entre un epítipo con su sitio de unión a antígeno en el anticuerpo y la valencia del anticuerpo, que hace referencia al número de sitios de unión al antígeno específicos de un epítipo concreto. Los anticuerpos normalmente se unen con una constante de disociación (Kd) de 10^{-5} a 10^{-11} litros/mol. Cualquier Kd superior a 10^{-4} litros/mol generalmente se considera que indica unión inespecífica. Cuando menor es el valor de la Kd, mayor es la fuerza de la unión entre un determinante antigénico y el sitio de unión del anticuerpo.

Los anticuerpos de la presente invención, o fragmentos de los mismos, también incluyen aquéllos para los que las características de unión se han mejorado mediante mutación directa, procedimientos de maduración de la afinidad, expresión e fagos o reordenamiento de cadenas. La afinidad y la especificidad se pueden mejorar o modificar a través de mutaciones de CDR y/o residuos de FW y detección selectiva de sitios de unión a antígeno que tienen la características deseadas (véase, por ejemplo, Yang y col., J. Mol. Biol. (1995), 254: 392 - 403). Un modo es aleatorizar los residuos individuales o combinaciones de residuos de modo que, en una población de, por otro lado, sitios de unión a antígeno idénticos, cuyas subpoblaciones de dos a veinte aminoácidos se encuentran en posiciones concretas. Como alternativas, se pueden inducir mutaciones en una amplia gama de residuos mediante procedimientos de PCR de tendencia a error (véase, por ejemplo, Hawkins et al., J. Mol. Biol., (1992) 226: 889 - 96). En otro ejemplo, los vectores de expresión en fagos que contienen genes de la región variable de la cadena pesada y ligera se pueden propagar en las cepas mutadoras de E. coli (véase, por ejemplo, Low y col., J. Mol. Biol., (1996) 250: 359 - 68). Estos procedimientos de mutagénesis son ilustrativos de los muchos procedimientos conocidos por el experto en la técnica.

Equivalentes de los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, de la presente invención incluyen polipéptidos con secuencias de aminoácidos sustancialmente iguales a la secuencia de aminoácidos de las regiones variables o hipervariables de los anticuerpos IGF-IR de longitud completa. En el presente documento se define sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos como una secuencia con una homología de al menos un 70 %, preferentemente al menos aproximadamente un 80 % y, más preferentemente, al menos aproximadamente un 90 % con otra secuencia de aminoácidos, determinado mediante el procedimiento de búsqueda FASTA de acuerdo con Pearson y Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85: 2444 - 8).

Una sustitución conservadora de aminoácidos se define como un cambio en la composición de los aminoácidos cambiando uno o dos aminoácidos de un péptido, polipéptido o proteína, o fragmento de los mismos. La sustitución es de aminoácidos con propiedades generalmente similares (p. ej., ácidos, básicos, aromáticos, de tamaño, de carga positiva o negativa, con polaridad, sin polaridad) de modo que las sustituciones no alteran sustancialmente las características del péptido, polipéptido o proteína (p. ej., la carga, el punto isoeléctrico, la afinidad, la avidez, la conformación, la solubilidad) o la actividad. Las sustituciones típicas que se pueden realizar para tal sustitución conservadora de aminoácidos pueden estar entre los grupos de aminoácidos de la siguiente manera:

glicina (G), alanina (A), valina (V), leucina (L) e isoleucina (I);

ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);

alanina (A), serina (S) y treonina (T); e

histidina (H), lisina (K) y arginina (R);

asparagina (N) y glutamina (Q);

fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W).

Las sustituciones conservadoras de aminoácidos pueden realizarse en, por ejemplo, las regiones que flanquean las regiones hipervariables responsables principalmente de las características de unión selectivas y / o específica de la molécula, así como otras partes de la molécula, por ejemplo, el casete de la cadena pesada variable.

Cada dominio de los anticuerpos de la presente invención puede ser un anticuerpo completo con el dominio variable de la cadena pesada o ligera o puede ser un equivalente funcional o un mutante o derivado de un dominio de origen natural o un dominio sintético construido, por ejemplo, *in vitro* usando una técnica tal como una descrita en el documento WO 93/11236 (Griffiths et al.). Por ejemplo, es posible unir los dominios correspondientes a los dominios variables del anticuerpo, que carecen de al menos un aminoácido. El rasgo característico importante es la capacidad de cada dominio para asociarse con un dominio complementario para formar un sitio de unión al antígeno. De acuerdo con lo anterior, no debe interpretarse que los términos fragmento variable de cadena pesada excluyen las

variantes que no tienen un efecto material sobre la especificidad.

En una realización preferida, los anticuerpos anti-IGF-IR de la presente invención son anticuerpos humanos que exhiben una o más de las siguientes propiedades.

5 1) los anticuerpos se unen al dominio externo del IGF-IR e inhiben la unión de IGF-I o IGF-II a IGF-IR. La inhibición se puede determinar mediante, por ejemplo, un ensayo de unión directa usando receptor purificado o unido a la membrana. En esta realización, los anticuerpos de la presente invención, o fragmentos de los mismos, se unen preferentemente al IGF-IR con al menos la misma fuerza que los ligandos naturales del IGF-IR (IGF-I e IGF-II).

10 2) Los anticuerpos neutralizan el IGF-IR. La unión del ligando, por ejemplo IGF-I o IGF-II, a un dominio extracelular externo del IGF-IR estimula la autofosforilación de la subunidad beta y la fosforilación de los sustratos de IGF-IR, incluyendo MAPK, Akt e IRS-1.

15 La neutralización de IGF-IR incluye la inhibición, disminución, inactivación y/o alteración de una o más de estas actividades, normalmente asociadas con la transducción de señal. Además, esto incluye la inhibición de heterodímeros de IGF-IR /IR, así como homodímeros de IGF-IR. Por tanto, la neutralización del IGF-IR tiene varios efectos, incluidos inhibición, disminución, inactivación y/o alteración del crecimiento (proliferación y diferenciación), angiogénesis (reclutamiento de los vasos sanguíneos, invasión y metástasis) y motilidad celular y metástasis (adhesión y capacidad de invasión de las células).

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

25 Otra medida de neutralización del IGF-IR es la inhibición de la fosforilación de los sustratos cadena debajo de IGF-IR. De acuerdo con esto se puede medir el nivel de fosforilación de MAPK, Akt, o IRS-1. La disminución de la fosforilación del sustrato es de al menos aproximadamente un 50 %, preferentemente al menos aproximadamente un 65 %, más preferentemente de al menos aproximadamente un 80%.

30 Además, se pueden usar procedimientos para la detección de la expresión de proteínas para determinar la neutralización del IGF-IR, en los que la actividad tirosina cinasa de la IGF-IR. Estos procedimientos incluyen inmunohistoquímica (IHQ) para la detección de la expresión de proteínas, hibridación con fluorescencia in situ (FISH) para la detección de la amplificación génica, ensayos de unión competitiva con radioligando, técnicas de transferencia en matriz sólida, tales como transferencias Northern y Southern, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) y ELISA. Véase, por ejemplo, Grandis y col., Cancer, 78:128 - 492 (1996); Shimizu y col., Japan J. Cancer Res., 85:567 - 71(1994); Sauter y col., Am. J. Path., 148:104753 (1996); Collins, Glia, 15:28996 (1995); Radinsky y col., Clin. Cancer Res. 1:19 - 31 (1995); Petrides y col., Cancer Res. 50:393439 (1990); Hoffmann et al., Anticancer Res. 17:441926 (1997); Wikstrand y col., Cancer Res. 55:3140 - 48 (1995).

35 También se pueden usar ensayos *in vivo* para determinar la neutralización del IGF-IR. Por ejemplo, mediante ensayos con mitógenos se puede observar inhibición de la tirosina cinasa del receptor usando líneas celulares estimuladas con el ligando del receptor en presencia y ausencia de inhibidor. Por ejemplo, se pueden usar células MCF7 (Colección Americana de CULTIVOS Tipo (ATCC), Rockville, MD) estimuladas con IGF-I o IGF-II para investigar la inhibición del IGF-IR. Otro procedimiento implica analizar la inhibición del crecimiento de células tumorales que expresan IGF-IR o células transfectadas para expresar IGF-IR. También se puede observar inhibición usando modelos tumorales, por ejemplo células tumorales humanas inyectadas en un ratón.

40 La presente invención no está limitada por ningún mecanismo concreto de neutralización del IGF-IR. Los anticuerpos anti-IGF-IR de la presente invención se pueden unir externamente al receptor del EGF de la superficie celular, bloquear la unión del ligando (p. ej., IGF-I o IGF-II) y la posterior transducción de la señal medida por la tirosina cinasa asociada al receptor y prevenir la fosforilación del IGF-IR y otras proteínas cadena abajo en la cascada de la transducción de señal.

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

Otro modo es medir directamente la cantidad del receptor presente sobre la célula siguiendo el tratamiento con un anticuerpo anti-IGF-IR u otra sustancia, por ejemplo mediante análisis de clasificación celular activada por fluorescencia de células teñidas para la expresión en superficie del IGF-IR. Las células teñidas se incuban a 37°C y la intensidad de fluorescencia se mide en el tiempo. Como control, parte de la población teñida se puede incuban a 4°C (condiciones bajo las cuales se detiene la internalización del receptor).

Como se describe en los ejemplos, el IGF-IR de la superficie celular se puede detectar y medir usando un anticuerpo diferente que sea específico de IGF-IR y que no bloquea ni compite con la unión del anticuerpo que se está analizando. (Burtrum, y col., Cancer Res. 63:891221 (2003)) El tratamiento de una célula que expresa IGF-IR con un anticuerpo de la invención tienen como resultado la reducción del IGF-IR en la superficie celular. En una realización preferida, la reducción es de al menos aproximadamente un 70%, más preferentemente al menos aproximadamente un 80% e incluso más preferentemente al menos al menos aproximadamente un 90% en respuesta al tratamiento con un anticuerpo de la invención. Se puede observar una disminución significativa en tan solo cuatro horas.

Otra medida de la modulación por disminución es la reducción de la proteína receptora total presente en una célula y releja la degradación de los receptores internos. De acuerdo con lo anterior, el tratamiento de células (en particular células cancerosas) con anticuerpos de la invención tiene como resultado una reducción del IGF-IR celular total. En una realización preferida, la reducción es de al menos aproximadamente un 70%, más preferentemente de al menos aproximadamente un 80% e incluso más preferentemente de al menos aproximadamente un 90%.

Los anticuerpos de la invención se unen al IGF-IR con una K_d de aproximadamente 3×10^{-10} M o menor, preferentemente de aproximadamente 1×10^{-10} M o menor y, más preferentemente de aproximadamente 3×10^{-11} M o menor.

En una realización de la invención, los anticuerpos inhiben el crecimiento del tumor. Por ejemplo, se pueden establecer tumores de xenoinjerto subcutáneos mediante inyección de células de una línea celular de cáncer en un ratón inmunodeficiente. Después, los ratones se tratan mediante inyección intraperitoneal de anticuerpos, por ejemplo, cada tres días, y el tamaño del tumor se mide a intervalos regulares. En comparación con las inyecciones de control, los anticuerpos de la invención inhiben el crecimiento del tumor. En una realización preferida, un anticuerpo de la invención estimula la regresión del tumor cuando se combina con un agente antineoplásico. Adicionalmente, como se ilustra más adelante, en una realización más preferida, los anticuerpos de la invención que estimulan la regresión del tumor cuando se usa en monoterapia. Con estimulación de la regresión del tumor se entiende que la administración de una cantidad eficaz de anticuerpo, o una cantidad eficaz de una combinación de un anticuerpo y un agente neoplásico tiene como resultado una reducción del tamaño o la necrosis del tumor. En una realización preferida de la invención, la regresión del tumor se puede observar y continuar durante un período de al menos aproximadamente 20 días, más preferiblemente al menos aproximadamente 40 días, más preferiblemente al menos aproximadamente 60 días. La regresión del tumor se puede medir como un promedio de un grupo de sujetos sometidos a un régimen de tratamiento particular, o se puede medir mediante el número de sujetos en un grupo de tratamiento en el que los tumores remiten.

Los anticuerpos preferidos de la presente invención, o fragmentos de los mismos, son anticuerpos humanos que tienen uno, dos, tres, cuatro, cinco y / o seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) seleccionadas del grupo que consiste en las SEC ID N° 14, SEC ID N° 16, SEC ID N° 18, SEC ID N° 20, SEC ID N° 22, SEC ID N° 24, SEC ID N° 26, SEC ID N° 28 y SEC ID N° 30. Preferentemente, los anticuerpos (o fragmentos del mismo) de la presente invención tienen CDR de las SEC ID N° 14, SEC ID N° 16 and SEC ID N° 18. Como alternativa y también preferentemente, los presentes anticuerpos, o fragmentos de los mismos, tienen CDR de SEC ID N° 20, SEC ID N° 22 and SEC ID N° 24. Como alternativa, y también preferentemente, los presentes anticuerpos, o fragmentos de los mismos, tienen CDR de SEC ID N° 26, SEC ID N° 28 and SEC ID N° 30. Las secuencias de aminoácidos de las CDR se exponen más adelante en la Tabla 1.

TABLA 1

Cadena pesada (2F8/A12)		
CDR1	SYAIS	SEC ID N° 14
CDR2	GIPIFGTANYAQKFQG	SEC ID N° 16
CDR3	APLRFLEWSTQDHYYYYYMDV	SEC ID N° 18
Cadena ligera (2F8)		
CDR1	QGDSLRSYYAS	SEC ID N° 20
CDR2	GKNNRPS	SEC ID N° 22
CDR3	NSRDNSDNRLI	SEC ID N° 24
Cadena ligera (A12)		
CDR1	QGDSLRSYYAT	SEC ID N° 26

CDR2	GENKRPS	SEC ID N° 28
CDR3	KSRDGSQGHLV	SEC ID N° 30

En otras realizaciones, los presentes anticuerpos, o fragmentos de los mismos, pueden tener una región variable de la cadena pesada de SEC ID N° 2 y/o una región variable de la cadena ligera seleccionada de las SEC ID N° 6 o SEC ID N° 10. El IMC-A12 es un anticuerpo particularmente preferido de la presente invención. Este anticuerpo tiene regiones estructurales de V_H y V_L (FW) además de CDR. El dominio variable V_H de IMC-A12 (SEC ID N° 2) tiene tres CDR que corresponden a las SEC ID N° 14, 16, and 18 y el dominio V_L (SEC ID N° 10) tiene tres CDR correspondientes a las SEC ID N° 26, 28 y 30. IMC-2F8 es otro anticuerpo preferido de la presente invención. Este anticuerpo también tiene regiones marco de V_H y V_L (FW) y CDR. El dominio variable de V_H de IMC-2F8 es idéntico al dominio variable de V_H de IMC-A12. El dominio V_L de IMC-2F8 (SEC ID N° 6) tiene tres CDR correspondientes a las SEC ID N° 20, 22 y 24.

En otra realización, los anticuerpos de la invención compiten por la unión a IGF-IR con IMC-A12 y/o IMC-2F8. Es decir, los anticuerpos se unen al mismo epítipo solapante o similar.

La presente invención también proporciona polinucleótidos aislados que codifican los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, descritos anteriormente. La invención incluye ácidos nucleicos que tienen una secuencia que codifica uno, dos, tres, cuatro, cinco y / o las seis CDR como se expone en la Tabla 2.

TABLA 2

Cadena pesada (2F8/A12)		
CDR1	agctatgcta tcagc	SEC ID N° 13
CDR2	gggatcatcc ctatctttgg tacagcaaac tacgcacaga agttccaggg c	SEC ID N° 15
CDR3	gcgccattac gatttttggga gtggtccacc caagaccact actactacta ctacatg gacgtc	SEC ID N° 17
Cadena ligera (2F8)		
CDR1	caaggagaca gcctcagaag ctattatgca agc	SEC ID N° 19
CDR2	ggtaaaaaca accggccctc a	SEC ID N° 21.
CDR3	aactccggg acaacagtga taaccgtctg ata	SEC ID N° 23
Cadena ligera (A12)		
CDR1	caaggagaca gcctcagaag ctattatgca acc	SEC ID N° 25
CDR2	ggtgaaaata agcggccctc a	SEC ID N° 27
CDR3	aaatctcggg atggcagtg tcaacatctg gtg	SEC ID N° 29

Se puede preparar ADN que codifica anticuerpos humanos mediante recombinación de ADN que codifica las regiones constantes y las regiones variables humanas, aparte de las CDR, derivadas sustancialmente o exclusivamente de las regiones de anticuerpo humano correspondientes y ADN que codifica las CDR derivadas de ser humano (p ej., SEC ID N° 13, 15 y 17 para las CDR del dominio variable de la cadena pesada y las SEC ID N° 19, 21 y 23 o SEC ID N° 25, 27 y 29 de las CDR del dominio variable de la cadena ligera).

Otras fuentes adecuadas de ADN que codifican fragmentos de anticuerpos incluyen cualquier célula, tal como hibridomas y esplenocitos que expresan al anticuerpo de longitud completa. Los fragmentos se pueden usar por sí mismos como equivalentes de anticuerpos o se pueden recombinar en equivalentes, como se ha descrito anteriormente. Las recombinaciones de ADN y otras técnicas descritas en esta sección pueden llevarse a cabo mediante procedimientos conocidos. Otras fuentes de ADN son anticuerpos de cadena sencilla o Fab producidos de una biblioteca de expresión en fagos, como se conoce en la técnica.

Adicionalmente, la presente invención proporciona vectores de expresión que contienen las secuencias polinucleótidas descritas anteriormente unidas operablemente a una secuencia de expresión, un promotor y una secuencia potenciadora. Se han desarrollado varios vectores de expresión para la síntesis eficaz del polipéptido de anticuerpo en sistemas procariotas, tales como bacterias, y eucariotas, incluidos, entre otros, sistemas de cultivo celular en levaduras y mamíferos. Los vectores de la presente invención pueden comprender segmentos de secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético.

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

En la técnica se conocen vectores de expresión eucariota adicionales (por ejemplo, P.J. Southern and P. Berg, *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 327 - 41 (1982); Subramani et al., *Mol. Cell. Biol.* 1: 854 - 64 (1981); Kaufmann y Sharp, "Amplification And Expression of Sequences Cotransfected with a Modular Dihydrofolate Reductase Complementary DNA Gene," *J. Mol. Biol.* 159: 601 - 21 (1982); Kaufmann and Sharp, *Mol. Cell. Biol.* 159: 601 - 64 (1982); Scahill et al., "Expression And Characterization Of The Product Of A Human Immune Interferon DNA Gene In Chinese Hamster Ovary Cells," *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 80, 465459 (1983); Urlaub y Chasin, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 77: 4216 - 20, (1980).

Los vectores de expresión útiles en la presente invención contienen al menos una secuencia de control de la expresión que está unida operablemente a la secuencia de ADN o fragmento que se va a expresar. La secuencia control se inserta en el vector con el fin de controlar y regular la expresión de la secuencia de ADN clonado. Ejemplos de secuencias de control de la expresión útiles son el sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema *trc*, las principales regiones de operador y promotor del fago lambda, la región control de la proteína de cubierta fd, los promotores glicolíticos de levadura, por ejemplo el promotor de la 3-fosfoglicerato cinasa, los promotores de la fosfatasa ácida de levaduras, por ejemplo Pho5, los promotores de los factores de acoplamiento alfa de levaduras y los promotores derivados de polioma, adenovirus, retrovirus y virus de simio, por ejemplo los promotores tempranos y tardíos o SV40 y las otras secuencias de las que se sabe que controlan la expresión de genes de células procarióticas y eucarióticas y sus virus, o combinaciones de las mismas.

Cuando se desee expresar una construcción génica en levaduras, un gen de selección adecuado para usar en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levaduras YRp7. Stinchcomb y col. *Nature*, 282: 39 (1979); Kingsman y col., *Gene*, 7: 141 (1979). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levaduras que carece de la capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N° 44076 o PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85: 12 (1977). La presencia de daños en *trp1* en el genoma de la célula huésped levadura proporciona un ambiente eficaz para detectar transformación mediante crecimiento en ausencia de triptófano. De forma similar, las cepas de levaduras deficientes en *Leu2* (ATCC 20,622 o 38,626) se complementan con plásmidos conocidos portadores del gen *Leu2*.

La presente invención también proporciona células huésped recombinantes que contienen los vectores de expresión como se han descrito anteriormente. Los anticuerpos de la presente invención se pueden expresar en líneas celulares distintas a los hibridomas. Se pueden usar ácidos nucleicos que comprenden una secuencia que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención, para la transformación de una célula huésped de mamífero adecuada.

Las líneas celulares de preferencia concreta se seleccionan en base al nivel de expresión elevado, la expresión constitutiva de la proteína de interés y la contaminación mínima de las proteínas huésped. En la técnica se conocen bien líneas de células de mamífero disponibles como huéspedes e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas, tales como, entre otras, células NS0, células de ovario de cáncer chino (CHO), células de riñón de hámster neonato (BHK) y muchas otras, incluyendo líneas celulares de origen linfóide tales como linfoma, mieloma o células de hibridoma. Células eucariotas adicionales adecuadas incluyen levaduras y otros hongos. Huéspedes procariotas útiles incluyen, por ejemplo, *E. coli*, tales como *E. coli* SG-936, *E. coli* HB 101, *E. coli* W3110, *E. coli* X1776, *E. coli* X2282, *E. coli* DHI y *E. coli* MRC1, *Pseudomonas*, *Bacillus*, tales como *Bacillus subtilis* y *Streptomyces*.

Estas células huésped recombinantes presentes se pueden usar para producir un anticuerpo, o fragmento del mismo, cultivando las células en condiciones que permiten la expresión del anticuerpo o fragmento del mismo y purificando el anticuerpo o fragmento del mismo de la célula huésped o del medio que rodea a la célula huésped. Dirigir el anticuerpo expresado o fragmento para la secreción en las células huésped recombinantes se puede facilitar insertando una secuencia que codifica una señal o péptido líder secretor (véase Shokri y col., *Appl Microbiol Biotechnol.* 60: 654 - 64 (2003); Nielsen y col., *Prot. Eng.* 10:16 (1997) y von Heinje et al., *Nucl. Acids Res.* 14:468390 (1986)) en el extremo 5' del gen de interés que codifica el anticuerpo. Estos elementos de péptido líder secretor pueden derivar de secuencias procarióticas o eucarióticas. De acuerdo con esto se usan adecuadamente péptidos líderes secretores, siendo aminoácidos unidos al extremo N terminal de un polipéptido para dirigir el movimiento del polipéptido hacia fuera del citosol de la célula huésped y la secreción en el medio.

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

Otra realización para la preparación de anticuerpos en la presente invención es la expresión del ácido nucleico que codifica el anticuerpo de acuerdo con la invención en un animal transgénico que tiene insertada una porción sustancial del genoma productor de anticuerpo humano y se hace deficiente en la producción de anticuerpos endógenos. Los animales transgénicos incluyen, entre otros, ratones, cabras y conejos. Una realización adicional de la invención incluye la expresión del gen codificador del anticuerpo de en, por ejemplo, la glándula mamaria del animal para la secreción del polipéptido durante la lactancia.

Como se describe en los ejemplos siguientes, se pueden aislar anticuerpos anti-IGF-IR de alta afinidad de acuerdo con la presente invención a partir de una biblioteca de expresión en fagos de los genes de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera humanas. Por ejemplo, se puede obtener un dominio variable de la invención a partir de un linfocito de sangre periférica que contiene un gen reordenado de la región variable. Como alternativa se pueden obtener porciones del dominio variable, tales como regiones CDR y FW, de diferentes secuencias humanas. Más del 90% de los clones recuperados después de tres rondas de selección son específicos de IGF-IR. Las afinidades de unión para IGF-IR de los Fab seleccionados pueden estar en el rango de nM, que es tan alta como muchos anticuerpos bivalentes monoclonales anti-IGF-IR producidos utilizando tecnología de hibridoma.

Los anticuerpos, y fragmentos de de los mismos, de la presente invención se pueden obtener, por ejemplo, de anticuerpos naturales o de bibliotecas de expresión en fagos de Fac o scFv. Los anticuerpos de dominio único se pueden obtener mediante la selección de un dominio V_H o V_L de un anticuerpo o hibridoma de origen natural, o se seleccionan de una biblioteca de dominios V_H dominios o de una biblioteca de dominios V_L . Se entiende que los residuos de aminoácidos que son determinantes principales de la unión de anticuerpos de dominio único pueden estar dentro de las CDR definidas por Kabat, pero pueden incluir también otros residuos, tales como, por ejemplo, los residuos que de otro modo estarían enterrados en la interfaz V_H-V_L de un heterodímero V_H-V_L .

Los anticuerpos de la presente invención también incluyen aquéllos para los que las características de unión se han mejorado mediante mutación directa, procedimientos de maduración de la afinidad, expresión e fagos o reordenamiento de cadenas. La afinidad y la especificidad se pueden mejorar o modificar a través de mutaciones de CDR y detección selectiva de sitios de unión a antígeno que tienen la características deseadas (véase, por ejemplo, Yang y col., J. Mol. Biol., 254: 392 - 403 (1995)). Las CDR se mutan de diversos modos. Un modo es aleatorizar los residuos individuales o combinaciones de residuos de modo que, e una población de, por otro lado, sitios de unión a antígeno idénticos, los veinte aminoácidos se encuentran en posiciones concretas. Como alternativas, las mutaciones se inducen en un una amplia gama de residuos de CDR mediante procedimientos de PCR de tendencia a error (véase, por ejemplo, Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226: 889 - 896 (1992)). Por ejemplo, los vectores de expresión en fagos que contienen genes de la región variable de la cadena pesada y ligera se pueden propagar en las cepas mutadoras de E. coli (véase, por ejemplo, Low y col., J. Mol. Biol., 250: 359 - 368 (1996)). Estos procedimientos de mutagénesis son ilustrativos de los muchos procedimientos conocidos por el experto en la técnica.

La proteína usada para identificar los anticuerpos de unión a IGF-IR de la invención es, preferentemente, IGF-IR, y, más preferentemente, es el dominio extracelular de IGF-IR. El dominio extracelular del IGF-RI puede estar libre o conjugado con otra molécula.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden condensar a residuos de aminoácidos adicionales. Dichos residuos de aminoácidos pueden ser una cola peptídica, quizá para facilitar el aislamiento. También se contemplan otros residuos de aminoácidos para dirigir los anticuerpos a órganos o tejidos específicos.

En otro aspecto de la invención, los anticuerpos anti-IGF-IR o fragmentos de anticuerpos pueden unirse química o biosintéticamente a agentes antitumorales o agentes productores de señal detectable. Como se ilustra a continuación, los anticuerpos de la invención se internalizan eficazmente tras la unión a células portadoras de IGF-IR. Los agentes antitumorales unidos a un anticuerpo incluyen cualquier agente que destruye o daña un tumor a la que el anticuerpo se ha unido o en el entorno de la célula a la que el anticuerpo se ha unido. Por ejemplo, un agente antitumoral es un agente tóxico tal como un agente quimioterapéutico o un radioisótopo. Los expertos en la técnica conocen los agentes quimioterapéuticos adecuados e incluyen antraciclinas (p. ej., daunomicina y doxorubicina), metotrexato vindesina neocarzinostatina, cis-platino, clorambucilo, citosina arabinósido, 5-fluorouridina, melfalán, ricina y caliqueamicina. Los agentes quimioterapéuticos se conjugan con el anticuerpo usando procedimientos convencionales (véase, por ejemplo, Hermentin y Seiler, Behring Inst. Mitt. 82:197 - 215(1988)).

Los agentes productores de señal detectable son útiles *in vivo* e *in vitro* para fines diagnósticos. El agente productor de señales produce una señal mensurable que se puede detectar por medios externos, por lo general la medición de la radiación electromagnética. En su mayor parte, el agente productor de señal es una enzima o cromóforo, o emite luz por fluorescencia, fosforescencia o quimioluminiscencia. Los cromóforos incluyen colorantes que absorben luz en la región ultravioleta o visible, y pueden ser sustratos o productos de degradación de reacciones catalizadas por enzimas.

La invención contempla adicionalmente anticuerpos anti-IGF-IR o fragmentos de anticuerpos de la invención a los que están unidos los restos diana o indicadores. Los restos diana son los primeros miembros de los pares de unión. Los agentes antitumorales, por ejemplo, están conjugados a los segundos miembros de dichos pares y, de este modo, están dirigidos al sitio en el que se une la proteína de unión a antígeno. Un ejemplo común de dicho par de

unión es avidina y biotina. En una realización preferida, la biotina se conjuga con una proteína de unión a antígeno de la invención, de este modo, proporciona una diana para un agente antitumoral u otro resto que está conjugado con avidina o estreptavidina. Como alternativa, la biotina u otro resto están unido a una proteína de unión a antígeno de la invención y se usa como indicador, por ejemplo en un sistema diagnóstico en el que un agente productor de señal detectable está conjugado a avidina o estreptavidina.

Los expertos en la técnica también conocen radioisótopos adecuados para usar como agentes antitumorales. Por ejemplo, se usan ^{131}I o ^{211}At . Estos isótopos se unen al anticuerpo usando técnicas convencionales (véase, por ejemplo, Pedley et al., Br. J. Cancer 68, 69 - 73(1993)). Como alternativa, el agente antitumoral que se une al anticuerpo es una enzima que activa un profármaco. De este modo se administra un profármaco que permanece en su forma inactiva hasta que alcanza el sitio tumoral en el que se convierte en su forma de citotoxina una vez que se administra el complejo de anticuerpo. En la práctica, el conjugado anticuerpo-enzima se administra al paciente y se deja localizar en la región del tejido que se va a tratar. Después, el profármaco se administra al paciente de un modo tal que se produce la conversión del fármaco citotóxico en la región del tejido que se va a tratar. Como alternativa, el agente antitumoral conjugado con el anticuerpo es una citocina, tal como interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4) o factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). El anticuerpo dirige la citocina al tumor de modo que la citocina participa en el daño o la destrucción del tumor sin afectar a otros tejidos. La citocina se condensa con el anticuerpo a nivel de ADN usando técnicas de ADN recombinante convencionales.

Asimismo, la presente invención proporciona un procedimiento de tratar el crecimiento tumoral en un mamífero administrando al mamífero una cantidad eficaz de un anticuerpo como se ha descrito anteriormente. La ruta de señalización de IGF-IR se ha demostrado extensamente que es un factor causal en el desarrollo de muchos tipos de cáncer. Se ha demostrado que IGF-I and IGF-II son mitógenos fuertes para una amplia variedad de líneas celulares, incluyendo de próstata, de mama, de colon, de mieloma, de ovarios, de páncreas y de pulmón. Adicionalmente, se ha demostrado que las células de cáncer altamente metastásicas expresan niveles más altos de IGF-IR and IGF-II que las células tumorales menos propensas a metastatizar.

Los tumores adecuados para su tratamiento de acuerdo con la presente invención expresan, preferentemente IGF-IR. Aunque no se pretende quedar ligado a mecanismo alguno, las enfermedades y afecciones que se pueden tratar o prevenir mediante los presentes procedimientos incluyen, por ejemplo, aquellos en los que la angiogénesis patológica o el crecimiento tumoral se estimulan a través de un bucle paracrino y/o autocrino de IGF-IR. Por ejemplo, los tumores altamente metastásicos tienden a expresar tanto IGF-II como IGF-IR.

En una realización de la invención, los anticuerpos anti-IGF-IR se pueden administrar en combinación con uno o más de otros agentes antineoplásicos. Para ejemplos de terapias de combinación, véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6.217.866 (Schlessinger y col.). (Anticuerpos anti-EGFR en combinación con agentes antineoplásicos; documento WO 99/60023 (Waksal y col. (anticuerpos anti-EGFR en combinación con radiación). Se puede usar cualquier agente antineoplásico adecuado, tal como un agente quimioterapéutico, radiación o combinaciones de los mismos. El agente antineoplásico puede ser un agente alquilante o un anti-metabolito. Ejemplos de agentes alquilantes incluyen, entre otros, cisplatino, ciclofosfamida, melfalán y dacarbazina. Ejemplos de antimetabolitos incluyen, entre otros, doxorubicina, daunorubicina y paclitaxel, gemcitabina, e inhibidores de la topoisomerasa irinotecán (CPT-11), aminocamptotecina, camptotecina, DX-8951f, y topotecán (topoisomerasa I) y etopósido (VP-16) y tenipósido (VM-26) (topoisomerasa II). Cuando el agente anti-neoplásico es radiación, la fuente de la radiación puede ser externa (radioterapia con haz externo-EBRT) o interna (braquiterapia-BT) al paciente que se esté tratando. La dosis del agente antineoplásico administrado depende de numerosos factores, incluidos, por ejemplo, el tipo de agentes, el tipo y gravedad del tumor que se esté tratando y la vía de administración del agente. No obstante, debe destacarse que la presente invención no está imitada a ninguna dosis concreta.

Los agentes antineoplásicos que actualmente se conocen en la técnica o se están evaluando se pueden agrupar en diversas de estas clases, incluyendo, por ejemplo, inhibidores de la mitosis, agentes alquilantes, anti-metabolitos, antibióticos intercalantes, inhibidores del factor de crecimiento, inhibidores del ciclo celular, enzimas, inhibidores de la topoisomerasa, agentes anti-supervivencia, modificadores de la respuesta biológica, anti-hormonas y agentes antiangiogénesis.

Entre estas clases, los datos notificados en el presente documento sugieren que los inhibidores de la topoisomerasa son particularmente eficaces cuando se utilizan en combinación con anticuerpos que se unen a IGF-IR. De acuerdo con lo anterior, las realizaciones de la invención incluyen procedimientos en los que se administra un inhibidor de la topoisomerasa en combinación con un anticuerpo que se une a IGF-IR. Los inhibidores pueden ser inhibidores de la topoisomerasa I o de la topoisomerasa II. Los inhibidores de la topoisomerasa I incluyen irinotecán (CPT-11), aminocamptotecina, camptotecina, DX-8951f, topotecán. Los inhibidores de la topoisomerasa II incluyen etopósido (VP-16) y tenipósido (VM-26). En la actualidad se están evaluando otras sustancias con respecto a la actividad inhibidora de la topoisomerasa y la eficacia como agentes antineoplásicos. En una realización preferida, el inhibidor de la topoisomerasa es irinotecán (CPT-11). Los anticuerpos usados en combinación son anticuerpos de la invención que se unen a IGF-IR y tienen al menos una de las propiedades siguientes: (i) inhiben la unión de IGF-I o IGF-II a IGF-IR; (ii) neutralizan la activación de IGF-IR por el IGF-I o IGF-II; (iii) reducen el receptor de la superficie de IGF-IR y se unen al IGF-IR con una Kd de aproximadamente 1×10^{-10} M o menos. En una realización más preferida, los anticuerpos que se van a usar en combinación con un inhibidor de la topoisomerasa tienen las

características de los anticuerpos humanos expuestos anteriormente.

Los anticuerpos anti-IGF-IR de la invención se pueden administrar con anticuerpos que neutralizan otros receptores implicados en el crecimiento tumoral o en la angiogénesis. En una realización de la invención, se usa un anticuerpo anti-IGF-IR en combinación con un antagonista del receptor que se une específicamente a EGFR. Particularmente preferidas son las proteínas de unión a antígeno que se unen al dominio extracelular de EGFR y bloquean la unión de uno o más de sus ligandos y/o neutralizan la activación inducida por ligando de EGFR. Un antagonista de EGFR puede ser un anticuerpo que se une a EGFR o a un ligando de EGFR e inhibe la unión de EGFR a su ligando. Los ligandos del EGFR incluyen, por ejemplo, EGF, TGF- α , anfiregulina, EGF de unión a la heparina (HB-EGF) y betacelulina. Se piensa que EGF y TGF- α son los principales ligandos endógenos que tienen como resultado la estimulación mediada por EGFR, aunque se ha demostrado que el TGF- α es más potente en la estimulación de la angiogénesis. Debe apreciarse que el antagonista de EGFR se puede unir externamente a la porción extracelular de EGFR, que puede o no inhibir la unión del ligando, o internamente al dominio de la tirosina cinasa. Ejemplos de antagonistas del EGFR que se unen a EGFR incluyen, entre otros, moléculas biológicas, tales como anticuerpos (y equivalentes funcionales de los mismos) específicos de EGFR, y moléculas pequeñas, tales como inhibidores sintéticos de la cinasa que actúan directamente sobre el dominio citoplásmico del EGFR

Otro ejemplo de dicho receptor es VEGFR. En una realización de la presente invención se usa un anticuerpo anti-IGF-IR en combinación con un antagonista del VEGFR. En una realización de la invención, se usa un anticuerpo anti-IGF-IR en combinación con un antagonista del receptor que se une específicamente al receptor VEGFR-1/Flt-1. En otra realización se usa un anticuerpo anti-IGF-IR en combinación con un antagonista del receptor que se une específicamente al receptor VEGFR-2/KDR. Particularmente preferidas son las proteínas de unión a antígeno que se unen al dominio extracelular de VEGFR-1 o VEGFR-2 y bloquean la unión por sus ligandos (VEGFR-2 es estimulado con más fuerza por VEGF; VEGFR-1 es estimulado con más fuerza por PlGF, pero también por VEGF) y/o neutralizan la activación inducida por ligando. Por ejemplo, IMC-1121 es un anticuerpo humano que se une y neutraliza el VEGFR-2 (documento WO 03/075840; Zhu). Otro ejemplo es el AcMo 6.12 que es un scFv que se une a VEGFR-1 soluble y expresado en la superficie de la célula. El ScFv 6.12 comprende los dominios V_L y V_H del anticuerpo monoclonal de ratón AcMo 6.12. Una línea celular de hibridoma que produce el AcMo 6.12 se ha depositado en la ATCC número PTA-3344 según las disposiciones del Tratado de Budapest en el International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure y los reglamentos conforme al mismo (Tratado de Budapest).

Otros ejemplos de receptores del factor de crecimiento implicados en la tumorigénesis son los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), el factor de crecimiento neural (NGFR) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR).

En una realización alternativa adicional el anticuerpo frente a IGF-IR se puede administrar en combinación con uno o más adyuvantes adecuados, tales como, por ejemplo, citoquinas (IL-10 and IL-13, por ejemplo) u otros estimuladores inmunitarios, tales como, entre otros, quimiocinas, antígeno asociados con tumores y péptidos. Véase, *por ejemplo*, Larrivée y col., ant. No obstante, debe apreciarse que la administración de solo un anticuerpo anti-IGF-IR es suficiente para prevenir, inhibir o reducir la progresión del tumor de un modo terapéuticamente eficaz.

En una terapia de combinación, el anticuerpo anti-IGF-IR se administra antes, durante o después de comenzar la terapia con otro agente, así como cualquier combinación del mismo, es decir antes, durante y después o antes, durante y después de comenzar la terapia con el agente antineoplásico. Por ejemplo, el anticuerpo anti-IGF-IR se puede administrar entre 1 y 30 días, preferentemente 3 y 20 días, más preferentemente entre 5 y 12 días antes de comenzar la radioterapia. En una realización preferida de la invención, la quimioterapia se administra de forma concurrente con, o, más preferentemente después, de la terapia con anticuerpos.

En la presente invención, se puede usar cualquier procedimiento o vía para administrar anticuerpos anti-IGF-IR de la invención y, opcionalmente, para coadministrar agentes antineoplásicos y/o antagonistas de otros receptores. Los regímenes con agentes antineoplásicos usados de acuerdo con la invención incluyen cualquier régimen que se cree que es óptimamente adecuado para el tratamiento de la afección neoplásica del paciente. Diferentes neoplasias malignas pueden requerir el uso de anticuerpos antitumorales específicos y de agentes antineoplásicos específicos, que se determinará en base a cada paciente. Las vías de administración incluyen por ejemplo, administración oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. La dosis antagonista administrada depende de numerosos factores, incluidos, por ejemplo, el tipo de antagonistas, el tipo y gravedad del tumor que se esté tratando y la vía de administración de los antagonistas. No obstante, cabe destacar que la presente invención no está limitada a cualquier mecanismo o vía de administración concretos.

Se debe observar que un anticuerpo anti-IGF-IR de la invención se puede administrar como conjugado, que se une específicamente al receptor y libera una carga letal tóxica tras la internalización del ligando-toxina. El conjugado anticuerpo-fármaco/molécula pequeña se puede unir directamente entre sí o a través de un enlazador, péptido o no péptido.

En otro aspecto de la invención, un anticuerpo anti-IGF-IR de la invención se puede unir química o biosintéticamente a uno o más agentes antineoplásicos o antiangiogénicos..

La invención además contempla anticuerpos anti-IGF-IR a los que los restos diana o indicadores están unidos. Los restos diana son los primeros miembros de los pares de unión. Los agentes antineoplásicos, por ejemplo, están conjugados a los segundos miembros de dichos pares y, de este modo, están dirigidos al sitio en el que se une el anticuerpo anti-IGF-IR. Un ejemplo común de dicho par de unión es avidina y biotina. En una realización preferida, la biotina está conjugada a un anticuerpo anti-IGF-IR y, de este modo, proporciona una diana para un agente antineoplásico u otro resto, que está conjugado a avidina o estreptavidina. Como alternativa, la biotina u otro resto está unido a un anticuerpo anti-IGF-IR de la invención y se usa como indicador, por ejemplo en un sistema diagnóstico en el que un agente productor de señal detectable está conjugado a avidina o estreptavidina.

Se entiende que los anticuerpos anti-IGF-IR de la invención, cuando se usan en un mamífero con el fin de profilaxis o tratamiento, se administrarán en forma de una composición que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. Vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. Vehículos farmacéuticamente aceptables pueden también comprender cantidades minoritarias de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la vida de almacenamiento o la eficacia de las proteínas de unión. Las composiciones de la presente invención se pueden, como se conoce bien en la técnica, formular de modo que proporcionen una liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo tras la administración al mamífero.

La presente invención también incluye kits para inhibir el crecimiento tumoral y/o la angiogénesis, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-IGF-IR humano. Los kits pueden además contener cualquier antagonista adecuado de, por ejemplo, otro receptor del factor de crecimiento implicado en la tumorigénesis o la angiogénesis (p. ej., EGFR, VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2, PDGFR, NGFR, FGFR, etc., como se ha descrito anteriormente). Como alternativa, o además, los kits de la presente invención pueden además comprender un agente antineoplásico. En el presente documento se han descrito ejemplos de agentes antineoplásicos adecuados en el contexto de la presente invención. Los kits de la presente invención pueden comprender además un adyuvante; anteriormente también se han descrito ejemplos.

Además, incluido en el alcance de la presente invención está el uso de los presentes anticuerpos *in vivo* e *in vitro* para procedimientos de investigación o diagnósticos, que son bien conocidos en la técnica. Los procedimientos diagnósticos incluyen kits, que contienen anticuerpos de la presente invención.

De acuerdo con esto, los presentes anticuerpos del receptor pueden usarse *in vivo* e *in vitro* para procedimientos de investigación, diagnósticos, profilácticos o de tratamiento, que son bien conocidos en la técnica. Por supuesto, cabe entenderse y esperar que el experto en la técnica pueda realizar variaciones en los principios de la invención divulgados en el presente documento y se pretende incluir dichas modificaciones dentro del alcance de la presente invención.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención, pero no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención de ningún modo. Se pueden obtener descripciones detalladas de procedimientos convencionales, tales como los empleados en la construcción de vectores y plásmidos, la inserción de genes que codifican polipéptidos en dichos vectores y plásmidos, la introducción de plásmidos en las células huésped y la expresión y la determinación de las mismas de genes y productos génicos a partir de numerosas publicaciones, incluida Sambrook, J. y col., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); y Coligan, J. et al. (1994) *Current Protocols in Immunology*, Wiley & Sons, Incorporated.

Selección y modificación genética de anticuerpos monoclonales anti-IGF-IR humana

Con el fin de aislar anticuerpos de alta afinidad al receptor de IGF-I humano, se utilizó la porción extracelular recombinante de IGF-IR humano para cribar un biblioteca de Fab en bacteriófagos humanos no expuestos anteriormente que contiene $3,7 \times 10^{10}$ clones únicos (de Haard et al, J. Biol Chem 274:... 18218-30 (1999)). Los tubos se revistieron con IGF-IR soluble (50 µg/ml) y se bloqueó con 3 % de leche/PBS a 37 grados durante 1 hora. Los fagos se prepararon cultivando un almacén de biblioteca hasta el cultivo en fase log, recatando con el fago colaborador M13K07 y amplificando durante la noche a 30 °C en medio de cultivo 2YTAK que contiene selección de ampicilina y kanamicina. La preparación de fagos resultante se precipitó en 4 % de PEG/NaCl 0,5M y se resuspendió en 3 % de leche/PBS. Los receptores inmovilizados se incubaron después con la preparación de fagos durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, los tubos se lavaron 10 veces con PBST (PBS que contiene 0,1 % de Tween-20), seguido de 10 veces con PBS. El fago unido eluyó a TA durante 10 minutos con 1 ml de una solución recién preparada de trietilamina 100 mM. Los fagos eluidos se incubaron con 10 ml de células TG1 en fase medio-log a 37 °C durante 30 minutos en equilibrio y 30 minutos en agitación. Las células TG1 infectadas se sedimentaron y se sembraron en varias placas 2YTAG grandes y se incubaron durante la noche a 30 °C. Todas las colonias que crecieron en las placas se rasparon en de 3 a 5 ml de medio 2YTA, se mezcló con glicerol (concentración final: 10 %), se alicuotó y se almacenó a -70 °C. Para una segunda ronda de selección, se añadieron 100 µl de la reserva de fagos a 25 ml de medio 2YTAGy se cultivó hasta la fase medio-log. El cultivo se rescató con el fago colaborador M13K07, se amplificó, se precipitó y se usó para la selección siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, pero con una concentración reducida (5 µg/ml) de IGF-IR inmovilizado en tubos y aumentando el número de lavados

tras el proceso de unión. Se realizó un total de dos rondas de selección.

Se escogieron clones TG1 individuales y se cultivaron a 37 °C en placas de 96 pocillos y se rescataron con el fago colaborador M13K07 como se ha descrito anteriormente. La preparación del fago amplificada se bloqueó con 1/6 del volumen de 18 % de leche/PBS a TA durante 1 hora y se añadió a placas de microtitulación de 96 pocillos Maxi-sorp (Nunc) revestidas con IGF-IR (1 µg/ml x 100 µl). Tras incubar a TA durante 1 hora, las placas se lavaron 3 veces con PBST y se incubaron con un conjugado anti-fago M13-HRP de ratón (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Las placas se lavaron 5 veces, se añadió sustrato de TMB peroxidasa (KPL, Gaithersburg, MD) y la absorbancia a 450 nm se leyó usando un lector de microplacas (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A partir de 2 rondas de selección, el 80 % de los clones independientes fue positivo para la unión a IGF-IR.

La diversidad de los clones de Fab anti-IGF-IR tras la segunda ronda de selección se analizó mediante un patrón de digestión con enzimas de restricción (es decir, huella de ADN). El inserto génico de Fab de los clones individuales se amplificó mediante PCR usando cebadores: PUC 19 inverso (5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3'; SEC ID N° 31) Y fdtet seq (5'-GTCGTCTTTCCAGACGTTAGT-3'; SEC ID N° 32) que son específicas de las secuencias que flanquean a las regiones únicas del gen Fab dentro del vector fago. Cada producto amplificado se digirió con una enzima de corte frecuente, *Bst*NI, y se analizó en un gel de agarosa al 3 %. Se identificó un total de 25 patrones distintos. Las secuencias de AND de clones representativos de cada patrón de digestión se determinaron mediante secuenciación de dideoxinucleótidos.

Los plásmidos de clones individuales que exhiben una unión positiva a IGF-IR y un perfil de ADN único se usaron para transformar un huésped de *E. coli* no supresor HB2151. La expresión de los fragmentos Fab en HB2151 se indujo cultivando las células en medio 2YTA que contiene isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido 1 mM (IPTG, Sigma) a 30 °C. Un extracto periplásmico de las células se preparó resuspendiendo el sedimento celular en Tris 5 mM (pH 7,5) que contiene sacarosa al 20 % (p/v), NaCl 200 mM, EDTA 1 mM y PMSF 0,1 mM, seguido de incubación a 4 °C con suave agitación durante 1 hora. Tras la centrifugación a 15.000 rpm durante 15 minutos, la proteína Fab soluble se purificó del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad usando la columna de la Proteína G siguiendo el protocolo del fabricante (Amersham Pharmacia Biotech).

Los clones de Fab de unión candidatos se sometieron a detección selectiva según el bloqueo competitivo del ligando de IGF-I humano radiomarcado al IGF-IR inmovilizado (100 ng/pocillo) que revisten placas de 96 pocillos. Las preparaciones de Fab se diluyeron e incubaron con placas de IGF-IR durante 0,5 a 1 hora a temperatura ambiente en PBS/0,1 % de BSA. Después se añadió ¹²⁵I-IGF-I 40 pM y las placas se incubaron 90 minutos adicionales. Después, los pocillos se lavaron 3 veces con PBS/0,1 % BSA helado, se secaron y después se contaron en un contador de centelleo gamma. Se seleccionaron los candidatos que exhibieron una inhibición superior al 30 % de la unión del ligando radiomarcado control en un ensayo de un punto y se determinaron los títulos de bloqueo *in vitro*. Se identificaron cuatro clones. De estos, solo se mostró que un clon Fab 2F8 inhibía la unión al ligando en más del 50 %, con una CI_{50} de aproximadamente 200 nM, y se seleccionó para la conversión en el formato de IgG1 de longitud completa. La secuencia de la región variable de la cadena pesada y la secuencia de aminoácidos traducida para 2F8 se muestran en las Figuras 1 y 2, respectivamente. La secuencia de AND y la secuencia polipeptídica traducida de la cadena pesada de 2F8 modificada como IgG1 de longitud completa se muestran en las Figuras 3 y 4, respectivamente.

La secuenciación de Fab de 2F8 determinó que este Fab poseía una región constante de la cadena ligera lambda. La secuencia de AND y la secuencia de aminoácidos traducida de la cadena ligera 2F8 se muestran en las Figuras 5 y 6, respectivamente. Las secuencias para el formato de la cadena ligera lambda de longitud completa se muestran en las Figuras 7 y 8. El análisis cinético de unión se realizó en IgC 2F8 usando una unidad BIAcore. Se determinó que este anticuerpo se une al IGF-IR con una afinidad de 0,5 - 1 nM ($0,5 - 1 \times 10^{-9}$ M).

Con el fin de mejorar la afinidad de este anticuerpo se generó una biblioteca de fagos de Fab de segunda generación en la que la cadena pesada de 2F8 estaba conservada y la cadena ligera se varió hasta una diversidad superior a 10^8 especies únicas. Este procedimiento se denomina barajado de la cadena ligera y se ha usado con éxito para madurar la afinidad de los anticuerpos seleccionados por un antígeno diana dado (Chames et al., *J. Immunol.* 169:1110 - 18 (2002)). Después, esta biblioteca se cribó para detectar la unión al IGF-IR humano (10 µg/ml) siguiendo los procedimientos como se ha descrito anteriormente y el proceso de adsorción se repitió tres rondas adicionales con una concentración de IGF-IR reducida (2 µg/ml) para el enriquecimiento de los Fab de unión de alta afinidad. Se analizaron siete clones tras la cuarta ronda. Los 7 contenían la misma secuencia de ADN y el mismo perfil de digestión de restricción. El único Fab aislado se designó A12 y se mostró que poseía una región constante de la cadena ligera lambda. La secuencia de AND de la cadena ligera se muestra en la Figura 9 y la secuencia de aminoácidos en la Figura 10. La secuencia de la cadena ligera lambda completa y la secuencia polipeptídica traducida se muestran en las Figuras 11 y 12, respectivamente. La comparación de la secuencia de aminoácidos de las cadenas ligeras de 2F8 y A12 determinó que las dos regiones variables diferían en un total de 11 aminoácidos (consultense las Figuras 13 y 14). Nueve de los cambios estaban presentes en las regiones CDR, estando la mayoría (6 residuos de aminoácidos) dentro de la CDR3.

Una comparación de las afinidades de los dos anticuerpos (IgG completa) por el IGF-IR humano y su actividad de bloqueo de su ligando se muestra en la Tabla 3. Los resultados de la unión se determinaron mediante ELISA de

IGF-IR humano y representan la concentración del anticuerpo titulado necesario para alcanzar una unión del 50% respecto a la saturación. Los resultados del bloqueo representan el nivel de anticuerpos necesario para inhibir la unión del 50% del ligando ^{125}I -IGF-I al IGF-IR humano inmovilizado. La afinidad se determinó mediante análisis BIAcore según las especificaciones del fabricante (Pharmacia BIACORE 3000). El IGF-IR soluble se inmovilizó sobre los chips de sensores y se determinó la cinética de unión al anticuerpo.

Tabla 3. Características de unión al anticuerpo			
Anticuerpo	Unión (DE_{50})	Bloqueo (CE_{50})	Afinidad
2F8	2,0 nM	3 - 6 nM	$K_D = 6,5 \times 10^{-10}$
			$K_{on} = 2,8 \times 10^5$
			$K_{off} = 1,8 \times 10^{-4}$
A12	0,3 nM	0,6 - 1nM	$K_D = 4,1 \times 10^{-11}$
			$K_{on} = 7,2 \times 10^5$
			$K_{off} = 3,0 \times 10^{-5}$

Los cambios de los anticuerpos producidos en la cadena ligera de 2F8 para generar el anticuerpo A12 efectuaron una afinidad significativamente más alta de A12 por IGF-IR que 2F8. Al mismo tiempo, este aumento efectuó una capacidad mayor de unión de A12 por el receptor, como se determina mediante ELISA, y al menos un aumento de tres veces en la actividad de bloqueo del ligando para el receptor inmovilizado. La Figura 15 muestra una titulación representativa de los dos anticuerpos anti-IGF-IR en el ensayo de bloqueo del receptor. La actividad de A12 permaneció igual, independientemente de si la cadena ligera se había modificado con una región constante de clase lambda o kappa humana. El anticuerpo A12 modificado con una cadena ligera de clase lambda de utilizó en todos los procedimientos posteriores. En este ensayo, A12 inhibió la unión del IGF-I radiomarcado al IGF-IR en mayor medida que la competencia con el ligando frío. La actividad de 2F8 fue comparable a la competencia con el ligando frío. Esto es consistente con las afinidades relativas de los dos anticuerpos (véase la Tabla 3) y el IGF-I (0,5-1 nM).

Modificación por ingeniería y expresión de anticuerpos IgG1 IGF-IR completamente humanos para los clones de Fab

Las secuencias de ADN que codifican los genes de las cadenas pesada y ligera de los Fab 2F8 y A12 se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el kit Boehringer Mannheim Expand de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cebadores directos e inversos contenían secuencias para sitios de endonucleasa de restricción para la clonación en vectores de expresión de mamíferos. El vector receptor para la cadena pesada contenía toda la secuencia de ADNc de la región constante gamma 1 humana, flanqueada por un promotor eucariota fuerte y una secuencia de poliadenilación en 3'. Las secuencias de la cadena ligera lambda de longitud completa para 2F8 o A12 se clonaron cada una en un segundo vector que posee solo los elementos reguladores eucariotas para la expresión en células de mamífero. En este vector también hay presente un marcador seleccionable para la selección de los integrantes estables de ADN después de la transfección del plásmido en células de mamífero. Los cebadores directos también se modificaron con secuencias que codifican una fuerte secuencia de péptido señal de mamífero para la secreción adecuada del anticuerpo expresado. Tras la identificación de secuencias génicas de inmunoglobulina adecuadamente clonadas se secuenciaron los ADN y se analizó la expresión en una transfección transitoria. La transfección transitoria se realizó en la línea celular de primate COS7 utilizando lipofección, de acuerdo con las especificaciones del fabricante. A las 24 o 48 horas después de la transfección, se detectó la expresión de anticuerpo IgG completo en el sobrenadante del cultivo acondicionado mediante ELISA de unión a Fc anti-humano. Se prepararon placas de ELISA (96 pocillos) por recubrimiento con 100 ng / pocillo de un anticuerpo policlonal específico de Fc antihumano de cabra (Sigma) y se bloquearon con 5% de leche / PBS durante la noche a 4 ° C. Después, las placas se lavaron 5 veces con PBS. Se añadió sobrenadante acondicionado a los pocillos y se incubó durante 1,5 horas a temperatura ambiente. El anticuerpo unido se detectó con un anticuerpo de cadena ligera lambda-HRP de cabra anti- humano (Sigma) y se visualizó con reactivos de TMB y el lector de microplacas como se ha descrito en lo que antecede. La preparación a gran escala de anticuerpos anti-IGF-IR se logró mediante transfección transitoria a gran escala en células COS, mediante ampliación del procedimiento de lipofección o mediante transfección estable en una célula huésped adecuada tal como una línea celular de mieloma de ratón (NSO, Sp2 / 0) o una línea celular de ovario de hámster chino (CHO). El plásmido que codifica los anticuerpos anti-IGF-IR se transfectó en células huésped mediante electroporación y se seleccionó en medio de selección de fármaco adecuado durante aproximadamente dos semanas. Las colonias seleccionadas de forma estable se seleccionaron para detectar la expresión de anticuerpos mediante ELISA anti-Fc y los clones positivos se expandieron en medio de cultivo celular libre de suero. La producción de anticuerpos a partir de células transfectadas de manera estable se realizó en un cultivo en suspensión en matraces de agitación o biorreactores durante un período de hasta dos semanas. El anticuerpo generado por una transfección transitoria o estable se purificó por cromatografía de afinidad ProA (Harlow y Lane. Antibodies. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press. 1988), se eluyó en una solución salina tamponada neutra, y se cuantificó.

Determinación de la actividad de bloqueo del ligando de los anticuerpos monoclonales anti-IGF-IR sobre células tumorales humanas

Después, los anticuerpos anti-IGF-IR se analizaron para determinar el bloqueo del ligando radiomarcado en IGF-IR nativo sobre células tumorales humanas. Las condiciones de ensayo se realizaron según Arteaga y Osborne (Cancer Res. 49:6237 - 41 (1989)), con modificaciones menores. Las células de cáncer de mama humano MCF7 se sembraron en placas de 24 pocillos y se cultivaron durante la noche. Las monocapas subconfluentes se lavaron 2-3 veces en tampón de unión (medio Iscove / 0,1% de BSA) y el anticuerpo se añadió en tampón de unión de unión. Después de una breve incubación con el anticuerpo a temperatura ambiente, a cada pocillo se añadió ^{125}I -IGF-I 40 pM (aproximadamente 40.000 cpm/pocillo) y se incubaron durante una hora adicional con agitación suave. Después, los pocillos se lavaron tres veces con PBS / 0,1 % BSA helado. Las monocapas se lisaron después con 200 μl de NaOH 0,5N y se contaron en un contador gamma. Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 16. En células tumorales humanas, el anticuerpo A12 inhibió la unión del ligando al IGF-IR con una CI_{50} de 3 nM (0,45 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Esta fue ligeramente menor que la actividad inhibidora del ligandos IGF-I frío ($\text{CI}_{50} = 1 \text{ nM}$), per mejor que la actividad inhibidora del IGF-II frío ($\text{CI}_{50} = 9 \text{ nM}$). Las diferencias observadas para los dos ligandos de IGF probablemente se puedan atribuir a la cinética de unión más lenta de IGF-II por IGF-IR que el ligando IGF-I (Jansson et al., J. Biol. Chem. 272:8189 - 97 (1997)). Se determinó que la CI_{50} para el anticuerpo 2F8 era 30 nM (4,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Después, se determine la actividad de bloqueo del ligandos IGF-I del anticuerpo A12 en varios tipos de tumores humanos diferentes, Los resultados se muestran en la Tabla 4. El anticuerpo A12 fue eficaz en la unión al IGF-IR celular endógeno y en la inhibición de la unión del ligando a una serie de tipos de tumores humanos, incluyendo líneas celulares de tejido de mama, páncreas y colorrectal.

Tabla 4. Actividad inhibidora del anticuerpo A12 sobre la unión de IGF-I a diferentes tipos de tumores humanos		
Línea celular	Tipo de célula	CI_{50} de bloqueo
MCF7	mama	3 nM
T47D	mama	6 nM
OV90	ovarios	6 nM
BXPC3	pancreático	20 nM
HPAC	pancreático	10 nM
HT-29	colorrectal	10 nM
SK-ES1	sarcoma de Ewing	2 nM
8226	mieloma	20 nM

El IGF-IR comparte una considerable homología con el receptor de la insulina (IR). Para determinar si los anticuerpos anti-IGF-IR eran específicos de este IGF-IR y no bloqueaban la unión a la insulina se realizó un ensayo de bloqueo a base de células con células de cáncer de mama ZR-75i humanas. Debido a que la insulina puede unirse a IGF-IR, aunque con una afinidad tres órdenes de magnitud menor que para el IR, se utilizó la línea de cáncer de mama humano ZR-75I que posee una mayor proporción de IR a IGF-IR en comparación con las células MCF7. Mediante el uso de esta línea, se razonó que la unión de la insulina a las células a la insulina sería más indicativa de unión a IR específica. El ensayo se realizó como se ha descrito anteriormente para las células MCF7 y los resultados mostrados en la Figura 17. Aunque la insulina fría fue capaz de valorar la unión de la insulina radiomarcada las células, ni 2F8 ni la alta afinidad del anticuerpo A12 bloqueaba la unión de la insulina, incluso a una concentración de 200 nM de anticuerpo, consistente con la unión selectiva de estos anticuerpos a IGF-IR IR y no a IR.

Inhibición mediada por anticuerpos de la mitogénesis celular dependiente de ligando

Con el fin de determinar si el bloqueo de la unión de IGF-I unión a IGF-IR inhibe la proliferación celular, se realizó un ensayo mitogénico en células de cáncer de mama MCF7, células de cáncer pancreático BxPC-3 y células de cáncer de colon HT-29. El ensayo se realizó de acuerdo con (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:2181 - 85 (1994)), con algunas modificaciones. Las células se sembraron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos a 5.000-10.000 células / pocillo y se dejó que se adhirieran durante la noche. El medio se reemplazó después con medio definido sin suero y se incubaron durante la noche a 37 ° C. Las células se incubaron después con IGF-I con o sin anticuerpo A12 y se incubaron durante la noche a 37 ° C. Después se añadió ^3H timidina 0,25 μCi a cada pocillo y se incubó durante 5 horas a 37 ° C. El sobrenadante se aspiró y las células se suspendieron mediante tripsinización durante 5 minutos. Las células se recogieron después sobre un filtro y se lavaron tres veces con agua, usando un recolector de células. Después de secar, el filtro se procesó para leer en un contador de centelleo. Los resultados se muestran en las Figuras 18 A, B y C (MCF7, BxPC-3 y HT-29, respectivamente). Los puntos de datos de IGF-I muestran la titulación del ligando para determinar la cantidad necesaria para lograr la máxima respuesta mitogénica. En la medición de la

actividad del anticuerpo A12 sobre varios tipos de células de cáncer, se añadió IGF-I a una concentración de 5 nM y el anticuerpo se tituló desde 200 nM a 0,05 nM. El anticuerpo A12 inhibió la mitogénesis de MCF7 en respuesta al ligando IGF-I de una forma dependiente de la dosis, con una CI_{50} de 6 nM.

- 5 El anticuerpo A12 se analizó después para determinar la inhibición mitogénica en varias líneas de células tumorales humanas adicionales y los resultados se muestran en Tabla 5. El anticuerpo A12 fue eficaz en la inhibición de la mitogénesis mediada por el ligando IGF-I de una variedad de líneas celulares de tumores humanos, incluyendo cáncer de mama, cáncer colorrectal, y mieloma múltiple.

Tabla 5. Actividad de inhibición del anticuerpo A12 sobre la mitogénesis de diferentes líneas celulares tumorales humanas		
Línea celular	Tipo de célula	CI_{50}
MCF7	mama	6 nM
T47D	mama	7 nM
BT474	mama	5 nM
BXPC3	pancreático	2 nM
HT-29	colorrectal	6 nM
SK-ES1	sarcoma de Ewing	10 nM
8226	mieloma	5 nM

Inhibición mediada por anticuerpos de la fosforilación del receptor dirigida por IGF-I y la señalización aguas abajo

- 10 Para visualizar el efecto inhibitorio de los anticuerpos anti-IGF-IR en la señalización de IGF-I se realizó un análisis de la autofosforilación y la fosforilación de la molécula efectora aguas abajo en la presencia o ausencia del anticuerpo o A12 o 2F8. La línea celular de cáncer de mama humana MCF7 se seleccionó para su uso debido a su alta densidad de IGF-IR. Las células se sembraron en placas de cultivo de 10 cm de 6 pocillos y se cultivaron hasta confluencia del 70-80 %. Las monocapas se lavaron dos veces en PBS y se cultivaron durante la noche en medio definido libre de suero. Después se añadió el anticuerpo anti-IGF-IR en medio libre de suero fresco (100 nM-10 nM) y las células se incubaron 30 minutos antes de la adición de ligando (10 nM). Las células se incubaron con el ligando durante 10 minutos, después introdujeron en hielo y se lavaron con PBS helado. Las células se lisaron mediante la adición de solución de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, 1% de Triton X-100, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, Na_3VO_4 0,5 mM, 1 μ g / ml de leupeptina, 1 μ g / ml de pepstatina, y 1 μ g / ml de aprotinina) y las células se rasparon en un tubo de centrífuga y se mantuvieron en hielo durante 15 minutos. Después, el lisado se aclaró mediante centrifugación a 4 ° C. A continuación, el IGF-IR se inmunoprecipitó (IP) a partir del lisado. El anticuerpo 3B7 (Santa Cruz) o A12 a 1 μ g/ml se incubaron con 400 μ l de lisado durante la noche a 4 °C. Después, los complejos inmunitarios se precipitaron mediante la adición de perlas de ProA-sefarsa durante 2 horas a 4 °C, se sedimentaron y se lavaron 3 veces con tampón de lisis. Los IP unidos a las esferas de ProA se rasparon en tampón de carrera en gel desnaturante. El lisado o IP se procesaron para electroforesis en gel desnaturante y se pasaron por un gel de acrilamida al 4-12% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa o nylon mediante transferencia Western de acuerdo con Towbin et al. (Biotechnology 24:145 - 9 (1992)). Proteína fosforilada en tirosina se detectó en la mancha utilizando un anticuerpo anti-p-tirosina (Cell Signaling #9411) y un anticuerpo secundario anti-ratón-HRP. El IGF-IR se detectó con anticuerpo monoclonal C-20 (Santa Cruz). Para la fosforilación de Akt, la fosfo-Akt se detectó con anticuerpo # 559029 y la Akt total, con # 559028 (BD Pharmingen). Para la fosforilación de MAPK, el fosfo-p44 / 42 se detectó con # 9101 y p44/42 total/ 42 con # 9102 (Cell Signaling Tech.). Las bandas se visualizaron con el reactivo ECL en la película de rayos-X.

- 35 Como se muestra en la Figura 19 A, la auto-fosforilación del IGF-IR en las células MCF7 se detuvo después de la privación de suero, y la adición de 2F8 o A12 solos no indujo la fosforilación del receptor, lo que demuestra una falta de actividad agonista detectable. Tras la adición de 10 nM de IGF-I, la fosforilación de IGF-IR se indujo fuertemente. El anticuerpo 2F8 efectuó una reducción de aproximadamente el 50 % en la fosforilación de IGF-IR, mientras que el anticuerpo A12 de alta afinidad casi completamente bloqueó la fosforilación. Del mismo modo, el anticuerpo A12 inhibió la auto-fosforilación de IGF-IR en células HT-29 de cáncer colorrectal y BxPC-3 de cáncer de páncreas (Fig. 19B).

- 40 La señalización efectora aguas abajo en respuesta a IGF-I también se inhibió mediante los anticuerpos anti-IGF-IR (Fig. 20). La fosforilación de MAPK se inhibió considerablemente por acción tanto de 2F8 como de A12. La fosforilación de la molécula de anti-apoptótica Akt fue menos sensible al bloqueo por el anticuerpo anti-IGF-IR con 2F8. Solo se efectuó una ligera reducción de la fosforilación de Akt. A12 inhibió significativamente la fosforilación de Akt, incluso a una concentración de 10 nM. El anticuerpo A12 era igualmente competente en la inmunoprecipitación del IGF-IR solubilizado como el anticuerpo 3B7 comercial, pero A12 no fue capaz de detectar IGF-IR

desnaturalizado inmovilizado en membranas de nylon después de la transferencia de tipo western.

Análisis de la unión por FAC del anticuerpo monoclonal A12 a las líneas de células tumorales.

Dado que A12 fue capaz de inmunoprecipitar el IGF-IR endógeno, los inventores se interesaron en determinar si A12 también podría usarse como anticuerpo de detección de células activadas por fluorescencia (FACS). Líneas celulares de tumores humanos se cultivaron, se rasparon en PBS enfriado en hielo, y se contaron. El anticuerpo primario, A12 (0,5 µg), se añadió a aproximadamente 5 millones de células en 250 µl de PBS / 5% de FBS y se incubaron en hielo durante 1 hora. Después, las células se diluyeron hasta 3 ml en PBS / FBS al 5%, se sedimentaron y se aspiró el sobrenadante. Después se añadió el fragmento F(ab)₂ de IgG anti-humana de cabra marcada con ficoeritrina (PE) secundaria en 250 µl PBS/5 % de FBS a 1:200 y se incubó en hielo durante 60 minutos. A continuación, las células se diluyeron de Nuevo y se sedimentaron, como antes, después se resuspendieron en 500 µl de PBS/5 % de FBS. A continuación, el análisis FACS se realizó en una unidad Epics XL (Coulter). Como se muestra en la Fig. 21, el anticuerpo A12 cambió totalmente la línea celular de cáncer de mama humano MCF7 y la leucemia humana línea celular HEL. Fibroblastos DE embrión de ratón negativos para IGF-IR (células R) (obtenidos a partir de R. Baserga, Thomas Jefferson University, Filadelfia, PA) sirvieron como control negativo. A12 no pudo unirse a estas células, indicativo de la especificidad de unión del anticuerpo por el IGF-IR. No obstante, A12 sí se unió y desplazó parcialmente la línea de células tumorales de ratón de carcinoma de pulmón de Lewis, lo que sugiere que este anticuerpo IGF-IR anti-humano posee cierta reactividad cruzada para el IGF-IR de ratón.

Internalización del receptor de IGF-I tras la unión del anticuerpo A12

Se ha demostrado que el anticuerpo A12 se une al IGF-IR nativo sobre células tumorales humanas con alta afinidad. El anticuerpo A12 se marcó con yodo radioactivo con ¹²⁵ yodo usando esferas de YODO (Pierce) según las instrucciones del fabricante. Las células del cáncer de mama humano MCF7 se sembraron en placas de 6 pocillos y se cultivaron durante la noche hasta un 50% de confluencia. Se añadió un microgramo de ¹²⁵ I-A12 a cada pocillo y se incubó a 37 ° C o se mantuvo en hielo a 4 ° C. Las placas se incubaron durante 30 minutos, 90 minutos, o 180 minutos y cada punto de tiempo se realizó por triplicado. El cultivo a 4 ° C se mantuvo durante 180 minutos. En cada punto de tiempo, los pocillos se lavaron 1x con PBS, después se destilaron durante 5 minutos con glicina 100mM - HCl, urea 2 M, pH 2,5. El material raspado, que representa el anticuerpo unido a la membrana, se mantuvo en hielo para el recuento. Los pocillos se lavaron 3 veces con PBS y las células se solubilizaron con NaOH 1N/ 1% de TritonX100. La fracción solubilizada representó el anticuerpo internalizado. Las fracciones raspadas y solubilizados se leyeron en un contador gamma y se representaron con la desviación estándar. Como se muestra en la Fig. 22, el nivel de radiactividad internalizada aumentó con el tiempo en las células cultivadas a 37 ° C, mientras que poca captación se observó en células mantenidas a 4 ° C, en las que el transporte de membrana debe estar muy retrasado. Esto demostró que, tras la unión a IGF-IR, el anticuerpo A12 se internaliza rápidamente, lo que conduce potencialmente a una depleción del receptor unido a la superficie.

La densidad del receptor de la superficie IGF-IR se determinó mediante FACS. Las células MCF 7 adherentes se trataron durante 4 horas con anticuerpo A12 50 nM de de IGF-I a 37 ° C. Las células se lavaron en PBS enfriado con hielo / 5% de BSA dos veces, y 1×10^6 células se dividieron en partes alícuotas a tubos de tinción y se colocaron en hielo. Después, un anticuerpo monoclonal de ratón no bloqueante específico de IGF-IR alfa-polipéptido (Ab-1, NeoMarkers, Fremont, CA), se incubó con las células a 4 ° C durante 2 horas. Después de lavados con PBS / BSA, las células se incubaron con anti-IgG de ratón. Después de lavar con PBS/BSA, las células se analizaron mediante ensayo de clasificación celular activada por fluorescencia usando citómetro de flujo FACSVantage SE (BD Bioscience). Como se muestra en la Fig. 22b, la exposición a A12 resultó en una reducción significativa en la intensidad de fluorescencia de las células MCF7, indicativo de una modulación por disminución del receptor de la debido a la internalización. La relación calculada entre la intensidad media de fluorescencia media indicó una reducción en la tinción de superficie de IGF-IR del 90% después de la incubación con A12. Este desplazamiento no se observó cuando las células se incubaron con A12 a 4 ° C, coherente con un proceso de internalización del receptor mediada por anticuerpos dependiente de la energía. La exposición de las células a IGF-I no causó un cambio significativo en la intensidad de fluorescencia del IGF-IR de superficie, en consonancia con el análisis de transferencia de tipo Western que muestra poco efecto de ligando sobre la degradación del IGF-IR.

El IGF-IR celular total se determinó en células HT-29 y BxPC-3 en respuesta al tratamiento con IGF-I o A12. Como se muestra en la Fig. 22c, la adición de IGF-I a los cultivos en crecimiento no tuvo ningún efecto sobre la expresión de IGF-IR. En contraste, la adición de anticuerpo A12 resultó en una intensa disminución de los niveles de IGF-IR en las células después de 3-6 horas.

Inhibición del crecimiento de los tumores colorrectales humanos, solos o en combinación con irinotecán (CPT-11).

Los inventores estaban interesados en determinar si los anticuerpos anti-IGF-IR eran capaces de inhibir el crecimiento de tumores humanos *in vivo* en un modelo de xenoinjerto de ratón atímico. Los tumores se indujeron ratones atómicos (nu / nu) de 3 – 4 semanas de edad mediante inyección subcutánea de 2-3 millones de células de cáncer colorrectal HT-29 humanas viables en medio de cultivo celular. Se dejó que los tumores se establecieran y se inició el tratamiento con el anticuerpo cuando el volumen del tumor alcanzó 200 mm³. En diez animales se inyectaron células tumorales por grupo de tratamiento. El anticuerpo se inyectó por vía intraperitoneal (i.p.) cada tres

días a 1 mg o 0,5 mg en 0,5 ml de TBS. El fármaco irinotecán (CPT-11) (LKT Laboratorios) se inyectó i.p. (100 mg / kg) una vez a la semana durante cuatro semanas desde el inicio del tratamiento con el anticuerpo. Los animales de control recibieron un anticuerpo de tipo IgG humano irrelevante de clase equivalente. Los tumores se midieron a intervalos regulares usando compás Vernier, se realizaron mediciones de la altura, anchura, y la longitud y se calcularon para determinar el volumen total del tumor. El estudio se terminó cuando los tumores control alcanzaron 3000 mm³. Como se muestra en la Fig. 23, las dosis del anticuerpo 2F8 a 0,5 mg o 1 mg cada tres días efectuaron una inhibición significativa (P <0,05) del crecimiento tumoral en este modelo. No hubo diferencia estadística entre los tamaños de los tumores de los grupos tratados con 0,5 o 1 mg de 2F8 y las respuestas fueron similares a las del tratamiento con CPT-11 solo. Cuando se administró 2F8 y CPT-11 juntos, la combinación dio como resultado una mayor inhibición del crecimiento del tumor (72% de disminución), lo que demuestra que la terapia anti-IGF-IR podría potenciar la actividad anti-tumoral del agente quimioterapéutico CPT-11 sobre el crecimiento tumoral.

Actividad antitumoral del anticuerpo A12 sobre tumores colorrectales humanos in vivo.

El anticuerpo A12 posee un afinidad 10 veces mayor por el IGF-IR que el anticuerpo 2F8. Dado que se observó una inhibición tumoral significativa *in vivo* con el anticuerpo 2F8, los inventores investigaron la actividad de A12 sobre el crecimiento de la línea de cáncer colorrectal humana HT-29 en un modelo de xenoinjerto de ratón. Los tumores se indujeron como se ha descrito anteriormente y se estableció tratamiento con anticuerpos en once tumores (tamaño de 200 mm³). Después, el tratamiento con anticuerpo se administró a una concentración de 1 mg, 100 µg, o 10 µg cada tres días durante todo el experimento. Se usaron diez animales por grupo de tratamiento y los animales control recibieron un anticuerpo control de tipo UgG de clase equivalente. Como se muestra en la Fig. 24, el anticuerpo A12 efectuó una reducción del 74% en el crecimiento del tumor en comparación con el control (P <0,05). Esto demostró que A12 era eficaz como una sola terapéutica en la inhibición del crecimiento del tumor colorrectal en este modelo de xenoinjerto. En este experimento se observó un claro efecto de respuesta a la dosis. También se observó una actividad antitumoral con una dosis de 100 µg de A12.

Actividad del anticuerpo A12 sobre el cáncer de mama humano in vivo en un modelo tumoral de xenoinjerto

El anticuerpo A12 exhibió una fuerte actividad inhibidora sobre la estimulación mitogénica dependiente de IGF y la proliferación de las células MCF7 *in vitro*. Con el fin de evaluar su actividad sobre el crecimiento del tumor MCF7 *in vivo*, se utilizó un modelo de tumor de xenoinjerto de ratón. Las células MCF7 se aislaron originalmente de un tumor humano dependiente de estrógenos y requieren estrógeno añadido exógenamente para el mantenimiento y el crecimiento *in vivo*. En ratones desnudos se implantaron gránulos de de estrógeno biodegradables (0,72mg de 17-β-estradiol / gránulo, liberación de 60 días). Además, en el momento de la inyección subcutánea de células tumorales, también se inyectó en los ratones por vía subcutánea en el flanco derecho 0,5 mg de estradiol en una suspensión de 50 µl de aceite de semilla de sésamo. Se dejó que los tumores se establecieran a un tamaño de aproximadamente 150 mm³ antes de iniciar el tratamiento con anticuerpos. El anticuerpo se inyectó a dosis de 1 mg, 100 µg, y 10 µg, cada tres días y continuó durante todo el experimento. A los 29 días, el tratamiento de los animales con 1 mg de A12 produjo una reducción del 89% en el crecimiento tumoral (Fig. 25). Fue evidente un crecimiento mínimo para los tumores establecidos en este grupo de tratamiento. Se observó una respuesta dependiente de la dosis para los tratamientos con A12 en este modelo. El estudio demostró que A12 era eficaz para reducir significativamente el crecimiento de una línea celular de cáncer de mama humano *in vivo*. Además, con el tratamiento con el anticuerpo solo a 1 mg / dosis se observó la regresión del tumor y continuó hasta el final del estudio (50 días).

Eficacia de A12 en combinaciones con CPT-11 o gemcitabina en xenoinjertos de carcinoma pancreático BxPC-3

En ratones atímicos nu / nu se inyectó por vía subcutánea 2 x 10⁶ de células de carcinoma de páncreas humano BxPC-3 mezcladas 1: 1 con Matrigel. Veinte días más tarde, cuando los tumores alcanzaron 200-300mm³, los ratones fueron aleatorizados y divididos en grupos de tratamiento: 1) control de TBS; 2) AcMo A12 a 1 mg / dosis, 3 veces a la semana; 3) 1 mg de irinotecán, una vez cada 7 días; 4) AcMo A12 + irinotecán; 5) 2,5 mg de gemcitabina, una vez cada 7 días; 6) AcMo A12 + gemcitabina. Todos los tratamientos se administraron mediante inyección intraperitoneal. Las medidas de los tumores se registraron dos veces a la semana utilizando la fórmula: Volumen = $(\pi/6) l \times w^2$.

El día 18 se sacrificó a tres animales por grupo y los tumores se resecionaron para su evaluación histológica media. El tratamiento y las mediciones de los tumores continuaron en los animales restantes hasta el día 44 con la excepción del grupo TBS. Este grupo de control fue sacrificado el día 37 debido a la ulceración del tumor y necrosis. Al final del estudio se registraron las medidas del tumor final, se sacrificó a los animales y en cuatro por grupo se extirparon los tumores para su evaluación histológica de punto final.

Los tumores BxPC-3 eran muy sensibles al AcMo A12 y 2 de ocho animales sufrieron regresiones parciales de los tumores después cinco semanas de tratamiento. La respuesta de los tumores BxPC-3 a irinotecán o a gemcitabina de forma individual fue comparable a la del anticuerpo, pero no hubo regresiones tumorales. El anticuerpo A12, cuando se combinó con irinotecán o gemcitabina fue más eficaz que cualquier agente de forma individual (Fig. 26), siendo irinotecán + AcMo A12 la combinación más eficaz. Para la combinación de A12 e irinotecán, tres de los nueve animales presentaron regresiones tumorales parciales. Sin embargo, no se produjeron regresiones tumorales entre los animales que recibieron irinotecán. (Tabla 5).

Tabla 5. Inhibición del crecimiento de xenoinjertos BxPC-3										
Día	AcMo A12		irinotecán		AcMo A12 + irinotecán		Gemcitabina		AcMo A12 + Gemcitabina	
	T/C %	Regresiones*	T/C %	Regresiones	T/C %	Regresiones	T/C %	Regresiones	T/C %	Regresiones
19	57	2 / 12	52	0 / 12	40	3 / 12	68	0 / 11	44	0 / 12
23	49	2 / 9	45	0 / 8	32	3 / 9	65	0 / 8	42	1 / 9
26	40	2 / 9	35	0 / 8	26	3 / 9	58	0 / 8	37	1 / 9
30	40	2 / 8	34	0 / 8	22	3 / 9	56	0 / 8	36	1 / 9
32	39	2 / 8	34	0 / 8	19	3 / 9	48	0 / 8	31	1 / 9
37	30	2 / 8	26	0 / 8	15	3 / 9	37	0 / 8	24	1 / 9
41	-	2 / 8	-	0 / 7	-	3 / 8	-	0 / 8	-	1 / 8
44	-	2 / 8	-	0 / 7	-	3 / 8	-	0 / 7	-	0 / 6
T/C % es la inhibición del crecimiento tumoral con respecto al control										
*regresiones definidas como volúmenes tumorales individuales < día 1 del tratamiento										

Eficacia de A12 en combinación con CPT-11 o paclitaxel en xenoinjertos de cáncer colorrectal HT-29

En ratones hembra atímicos nu / nu se inyectaron por vía subcutánea una suspensión de células de carcinoma de colon humano HT-29 a 5×10^6 células en 0,4 ml mezclados a 1: 1 con Matrigel. Cuando los tumores alcanzaron ~ 200 mm³, se aleatorizó a los ratones y se les dividió en grupos de tratamiento: 1) control de TBS; 2) AcMo A12 a 1 mg / dosis, 3 veces a la semana; 3) 2 mg de irinotecán, una vez cada 7 días; 4) AcMo A12 + irinotecán; 5) 121 µg de paclitaxel en 0,2 ml una vez cada 7 días; 6) AcMo A12 + paclitaxel. Todos los tratamientos se administraron mediante inyección intraperitoneal.

El tratamiento continuó durante seis semanas y las medidas de los tumores se registraron dos veces a la semana utilizando la fórmula: $Volumen = (\pi/6) \times w^2$. El día 21 se sacrificó a cuatro animales por grupo y los tumores se resecaron para su evaluación histológica. El tratamiento y las mediciones de los tumores continuaron en los animales restantes hasta el día 40. En ese momento se registraron mediciones tumorales finales, se sacrificó a los animales y en cuatro se extirparon los tumores para la evaluación histológica de punto final.

El AcMo A12, CPT-11, o paclitaxel en monoterapia inhibieron significativamente ($p < 0,02$) el crecimiento de los xenoinjertos de HT-29 en comparación con el grupo de control TBS (Fig. 27). La terapia de combinación del AcMo A12 con CPT-11 o paclitaxel mostró una inhibición significativa ($p < 0,003$) en el crecimiento tumoral en comparación con cualquiera de los tratamientos por separado.

No se observaron regresiones tumorales en los grupos de terapia individual. Los tumores de control *in situ* parecían muy vascularizados el día 22 como lo hicieron los grupos de terapia única el día 40. Sin embargo, la terapia de combinación con CPT-11 + AcMo A12 resultó en regresiones tumorales parciales en seis de los ocho animales, y la terapia de combinación con paclitaxel y AcMo A12 tuvo como resultado regresiones en tres de los ocho animales.

Tabla 6. Inhibición del crecimiento de xenoinjertos HT-29

Día	AcMo A12	CPT-11	paclitaxel	A12 + CPT-11		A12 + paclitaxel	
	T/C %	T/C %	T/C %	T/C %	Regresiones*	T/C %	Regresiones
12	69	63	66	52	0 / 12	48	1 / 12
15	62	59	59	42	0 / 12	40	3 / 12
19	64	61	62	30	3 / 12	32	5 / 12
22	58	52	56	24	4 / 8	28	4 / 8
26	62	47	54	17	6 / 8	27	3 / 8
29	61	45	55	14	6 / 8	24	3 / 8
33	58	40	52	11	5 / 8	22	3 / 8
36	53	40	45	9	5 / 8	22	2 / 8
40	54	41	52	10	2 / 6	26	2 / 8

T/C % es la inhibición del crecimiento tumoral con respecto al control
 *Regresiones definidas como volúmenes tumorales individuales < día 1 del tratamiento

Se entiende y se espera que un experto en la técnica puede hacer variaciones en los principios de la invención descritos en el presente documento y se pretende incluir tales modificaciones han dentro del alcance de la presente invención.

<110> ImClone Systems Incorporated

<120> Anticuerpos completamente humanos dirigidos contra el receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina humana

<130> 11245/53276

<140> pendiente de asignación

<141> 2004-05-03

<150> 60/467.177

<151> 2003-05-01

<160> 33

<170> Microsoft Word 97

<210> 1

<211> 390

<212> ADNA

ES 2 527 871 T3

<213> Humano

<400> 1

```

gag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg tcc
48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
5 10 15

tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga ggc acc ttc agc agc tat
96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

gct atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg 1
44
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

gga ggg atc atc cct atc ttt ggt aca gca aac tac gca cag aag ttc 1
92
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aaa tcc acg agc aca gcc tac 2
40
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 2
88
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg aga gcg cca tta cga ttt ttg gag tgg tcc acc caa gac cac tac 3
36
Ala Arg Ala Pro Leu Arg Phe Leu Glu Trp Ser Thr Gln Asp His Tyr
100 105 110

tac tac tac tac atg gac gtc tgg ggc aaa ggg acc acg gtc acc gtc 3
84
Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val
115 120 125

tca agc 3
90
Ser Ser
130

```

<210> 2

<211> 130

<212> PRT

<213> Humana

<400> 2

10

ES 2 527 871 T3

[illegible]

<210> 3
<211> 1440
<212> ADN
<213> Humano

<400> 3

ES 2 527 871 T3

```

atg gga tgg tca tgt atc atc ctt ttt cta gta gca act gca act gga
48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
5 10 15

gta cat tca gag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag
96
Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga ggc acc ttc 1
44
Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe
35 40 45

agc agc tat gct atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt 1
92
Ser Ser Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

gag tgg atg gga ggg atc atc cct atc ttt ggt aca gca aac tac gca 2
40
Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala
65 70 75 80

cag aag ttc cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aaa tcc acg agc 2
88
Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
85 90 95

aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg 3
36
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

tat tac tgt gcg aga gcg cca tta cga ttt ttg gag tgg tcc acc caa 3
84
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Leu Arg Phe Leu Glu Trp Ser Thr Gln
115 120 125

gac cac tac tac tac tac tac atg gac gtc tgg ggc aaa ggg acc acg 4
32
Asp His Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr
130 135 140

gtc acc gtc tca agc gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg 4
80
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
145 150 155 160

```

ES 2 527 871 T3

gca ccc tcc tcc aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc	5
28 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys	
165 170 175	
ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca	5
76 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser	
180 185 190	
ggc gcc ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc	6
24 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser	
195 200 205	
tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc	6
72 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser	
210 215 220	
ttg ggc acc cag acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac	7
20 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn	
225 230 235 240	
acc aag gtg gac aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac	7
68 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His	
245 250 255	
aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc	8
16 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val	
260 265 270	
ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc	8
64 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr	
275 280 285	
cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag	9
12 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu	
290 295 300	
gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag	9
60 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys	
305 310 315 320	
aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc	10
08	

ES 2 527 871 T3

Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	
				325					330					335		
gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aat	ggc	aag	gag	tac	aag	10
56																
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	
			340					345					350			
tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	gcc	ctc	cca	gcc	ccc	atc	gag	aaa	acc	atc	11
04																
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	
		355					360					365				
tcc	aaa	gcc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gaa	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	ccc	11
52																
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	
	370					375					380					
cca	tcc	cgg	gag	gag	atg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	ctg	12
00																
Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	
385					390					395					400	
gtc	aaa	ggc	ttc	tat	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	aat	12
48																
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	
				405					410					415		
ggg	cag	ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	ctg	gac	tcc	12
96																
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	
			420					425					430			
gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	ctc	acc	gtg	gac	aag	agc	agg	13
44																
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	
			435				440					445				
tgg	cag	cag	ggg	aac	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	ctg	13
92																
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	
	450					455					460					
cac	aac	cac	tac	acg	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ccg	ggg	aaa	tga	14
40																
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys		
465					470					475				479		

<210> 4
 <211> 479
 <212> PRT
 <213> Humana

<400> 4

ES 2 527 871 T3

Met	Gly	Trp	Ser	Cys	Ile	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Thr	Gly
				5					10					15	
Val	His	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys
			20					25					30		
Pro	Gly	Ser	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe
		35					40					45			
Ser	Ser	Tyr	Ala	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu
	50					55					60				
Glu	Trp	Met	Gly	Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala
65					70					75					80
Gln	Lys	Phe	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser
				85					90					95	
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ala	Pro	Leu	Arg	Phe	Leu	Glu	Trp	Ser	Thr	Gln
		115					120					125			
Asp	His	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Lys	Gly	Thr	Thr
	130					135					140				
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu
145					150					155					160
Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys
				165					170					175	
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
			180					185					190		
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
		195					200					205			
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
	210					215					220				
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn
225					230					235					240
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His
				245					250					255	

ES 2 527 871 T3

Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
			260					265					270		
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
		275					280					285			
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
	290					295					300				
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
305					310					315					320
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
				325					330						335
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
			340					345					350		
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
		355					360					365			
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
	370					375					380				
Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
385					390					395					400
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
				405					410					415	
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser
			420					425					430		
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
		435					440					445			
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu
	450					455					460				
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	
465					470					475				479	

<210> 5

<211> 327

5 <212> ADN

<213> Humano

<400> 5

10	tct	tct	gag	ctg	act	cag	gac	cct	gct	gtg	tct	gtg	gcc	ttg	gga	cag
	48															

ES 2 527 871 T3

```

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

aca gtc agg atc aca tgc caa gga gac agc ctc aga agc tat tat gca
96
Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
      20              25              30

agc tgg tac cag cag aag cca gga cag gcc cct gta ctt gtc atc tat   1
44
Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
      35              40              45

ggt aaa aac aac cgg ccc tca ggg atc cca gac cga ttc tct ggc tcc   1
92
Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
      50              55              60

agc tca gga aac aca gct tcc ttg acc atc act ggg gct cag gcg gaa   2
40
Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
      65              70              75              80

gat gag gct gac tat tac tgt aac tcc cgg gac aac agt gat aac cgt   2
88
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Asn Ser Asp Asn Arg
      85              90              95

ctg ata ttt ggc ggc ggg acc aag ctg acc gtc ctc agt   3
27
Leu Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser
      100              105              109

```

<210> 6
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Humana

<400> 6

```

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

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

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

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
      50              55              60
Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
      65              70              75              80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Asn Ser Asp Asn Arg
      85              90              95

Leu Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser
      100              105              109

```

<210> 7
 <211> 702
 <212> ADN
 <213> Humano

ES 2 527 871 T3

<400> 7

```

atg gga tgg tca tgt atc atc ctt ttt cta gta gca act gca act gga
48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
5 10 15

gta cat tca tct tct gag ctg act cag gac cct gct gtg tct gtg gcc
96
Val His Ser Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala
20 25 30

ttg gga cag aca gtc agg atc aca tgc caa gga gac agc ctc aga agc 1
44
Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser
35 40 45

tat tat gca agc tgg tac cag cag aag cca gga cag gcc cct gta ctt 1
92
Tyr Tyr Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu
50 55 60

gtc atc tat ggt aaa aac aac cgg ccc tca ggg atc cca gac cga ttc 2
40
Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
65 70 75 80

tct ggc tcc agc tca gga aac aca gct tcc ttg acc atc act ggg gct 2
88
Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala
85 90 95

cag gcg gaa gat gag gct gac tat tac tgt aac tcc cgg gac aac agt 3
36
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Asn Ser
100 105 110

```

ES 2 527 871 T3

```

gat aac cgt ctg ata ttt ggc ggc ggg acc aag ctg acc gtc ctc agt   3
84
Asp Asn Arg Leu Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser
115 120 125

cag ccc aag gct gcc ccc tcg gtc act ctg ttc ccg ccc tcc tct gag   4
32
Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
130 135 140

gag ctt caa gcc aac aag gcc aca ctg gtg tgt ctc ata agt gac ttc   4
80
Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
145 150 155 160

tac ccg gga gcc gtg aca gtg gcc tgg aag gca gat agc agc ccc gtc   5
28
Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
165 170 175

aag gcg gga gtg gag acc acc aca ccc tcc aaa caa agc aac aac aag   5
76
Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
180 185 190

tac gcg gcc agc agc tat ctg agc ctg acg cct gag cag tgg aag tcc   6
24
Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
195 200 205

cac aga agc tac agc tgc cag gtc acg cat gaa ggg agc acc gtg gag   6
72
His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
210 215 220

aag aca gtg gcc cct gca gaa tgc tct tga   7
02
Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser
225 230 233

```

<210> 8
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Humana

<400> 8

```

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

```

ES 2 527 871 T3

Val His Ser Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala
20 25 30

Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser
35 40 45

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

Val Ile Tyr Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
65 70 75 80

Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala
85 90 95

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Asn Ser
100 105 110

Asp Asn Arg Leu Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ser
115 120 125

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
130 135 140

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
165 170 175

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
180 185 190

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
195 200 205

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
210 215 220

Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser
225 230 233

<210> 9

<211> 327

5 <212> ADN

<213> Humano

<400> 9

10 tct tct gag ctg act cag gac cct gct gtg tct gtg gcc ttg gga cag
48

ES 2 527 871 T3

```

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

aca gtc agg atc aca tgc caa gga gac agc ctc aga agc tat tat gca
96
Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
      20              25              30

acc tgg tac cag cag aag cca gga cag gcc cct att ctt gtc atc tat   1
44
Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ile Leu Val Ile Tyr
      35              40              45

ggt gaa aat aag cgg ccc tca ggg atc cca gac cga ttc tct ggc tcc   1
92
Gly Glu Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
      50              55              60

agc tca gga aac aca gct tcc ttg acc atc act ggg gct cag gca gaa   2
40
Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
      65              70              75              80

gat gag gct gac tac tat tgt aaa tct cgg gat ggc agt ggt caa cat   2
88
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Lys Ser Arg Asp Gly Ser Gly Gln His
      85              90              95

ctg gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta ggt               3
27
Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
      100              105              109

```

<210> 10
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Humana

<400> 10

```

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

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

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

Gly Glu Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
      50              55              60
Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
      65              70              75              80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Lys Ser Arg Asp Gly Ser Gly Gln His
      85              90              95

Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
      100              105              109

```

<210> 11
 <211> 702
 <212> ADN
 <213> Humano

ES 2 527 871 T3

<400> 11

atg gga tgg tca tgt atc atc ctt ttt cta gta gca act gca act gga	
48	
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly	
5 10 15	
gta cat tca tct tct gag ctg act cag gac cct gct gtg tct gtg gcc	
96	
Val His Ser Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala	
20 25 30	
ttg gga cag aca gtc agg atc aca tgc caa gga gac agc ctc aga agc	1
44	
Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser	
35 40 45	
tat tat gca acc tgg tac cag cag aag cca gga cag gcc cct att ctt	1
92	
Tyr Tyr Ala Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ile Leu	
50 55 60	
gtc atc tat ggt gaa aat aag cgg ccc tca ggg atc cca gac cga ttc	2
40	
Val Ile Tyr Gly Glu Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe	
65 70 75 80	
tct ggc tcc agc tca gga aac aca gct tcc ttg acc atc act ggg gct	2
88	
Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala	
85 90 95	
cag gca gaa gat gag gct gac tac tat tgt aaa tct cgg gat ggc agt	3
36	
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Lys Ser Arg Asp Gly Ser	
100 105 110	

ES 2 527 871 T3

```

ggt caa cat ctg gtg ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta ggt      3
84
Gly Gln His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
115 120 125

cag ccc aag gct gcc ccc tcg gtc act ctg ttc ccg ccc tcc tct gag      4
32
Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
130 135 140

gag ctt caa gcc aac aag gcc aca ctg gtg tgt ctc ata agt gac ttc      4
80
Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
145 150 155 160

tac ccg gga gcc gtg aca gtg gcc tgg aag gca gat agc agc ccc gtc      5
28
Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
165 170 175

aag gcg gga gtg gag acc acc aca ccc tcc aaa caa agc aac aac aag      5
76
Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
180 185 190

tac gcg gcc agc agc tat ctg agc ctg acg cct gag cag tgg aag tcc      6
24
Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
195 200 205

cac aga agc tac agc tgc cag gtc acg cat gaa ggg agc acc gtg gag      6
72
His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
210 215 220

aag aca gtg gcc cct gca gaa tgc tct tga      7
02
Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser
225 230 233

```

<210> 12
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Humana

<400> 12

```

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

```

ES 2 527 871 T3

Val His Ser Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala
20 25 30

Leu Gly Gln Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser
35 40 45

Tyr Tyr Ala Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ile Leu
50 55 60

Val Ile Tyr Gly Glu Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe
65 70 75 80

Ser Gly Ser Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala
85 90 95

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Lys Ser Arg Asp Gly Ser
100 105 110

Gly Gln His Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
115 120 125

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
130 135 140

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
165 170 175

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
180 185 190

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
195 200 205

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
210 215 220

Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser
225 230 233

<210> 13
<211> 15
5 <212> ADN
<213> Humano

<400> 13

10 agc tat gct atc agc
15
Ser Tyr Ala Ile Ser
5

15 <210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> Humana

<400> 14

20 Ser Tyr Ala Ile Ser
5

ES 2 527 871 T3

<210> 15
 <211> 51
 <212> ADN
 5 <213> Humano
 <400> 15
 ggg atc atc cct atc ttt ggt aca gca aac tac gca cag aag ttc cag
 48
 Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 5 10 15
 ggc
 51
 Gly
 17
 10 <210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Humana
 15 <400> 16
 Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 5 10 15
 Gly
 17
 20 <210> 17
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> Humano
 25 <400> 17
 gcg cca tta cga ttt ttg gag tgg tcc acc caa gac cac tac tac tac
 48
 Ala Pro Leu Arg Phe Leu Asp Trp Ser Thr Gln Asp His Tyr Tyr Tyr
 5 10 15
 tac tac atg gac gtc
 63
 Tyr Tyr Met Asp Val
 20
 30 <210> 18
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Humana
 <400> 18
 35 Ala Pro Leu Arg Phe Leu Asp Trp Ser Thr Gln Asp His Tyr Tyr Tyr
 5 10 15
 Tyr Tyr Met Asp Val
 20
 40 <210> 19
 <211> 33
 <212> ADN

ES 2 527 871 T3

<213> Humano
 <400> 19
 caa gga gac agc ctc aga agc tat tat gca agc
 33
 Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
 5 5 10
 <210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 10 <213> Humana
 <400> 20
 Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser
 15 5 10
 <210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Humano
 20 <400> 21
 ggt aaa aac aac cgg ccc tca
 21
 Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
 5
 25 <210> 22
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Humana
 30 <400> 22
 Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser
 5
 <210> 23
 35 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Humano
 <400> 23
 40 aac tcc cgg gac aac agt gat aac cgt ctg ata
 33
 Asn Ser Arg Asp Asn Ser Asp Asn Arg Leu Ile
 5 10
 <210> 24
 <211> 11
 <212> PRT
 45 <213> Humana
 <400> 24
 Asn Ser Arg Asp Asn Ser Asp Asn Arg Leu Ile
 50 5 10
 <210> 25
 <211> 33

ES 2 527 871 T3

<212> ADN
 <213> Humano
 <400> 25
 5 caa gga gac agc ctc aga agc tat tat gca acc
 33
 Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Thr
 5 10
 <210> 26
 <211> 11
 10 <212> PRT
 <213> Humana
 <400> 26
 15 Gln Gly Asp Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Thr
 5 10
 <210> 27
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Humano
 <400> 27
 ggt gaa aat aag cgg ccc tca
 21
 Gly Glu Asn Lys Arg Pro Ser
 5
 25 <210> 28
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Humana
 30 <400> 28
 Gly Glu Asn Lys Arg Pro Ser
 5
 35 <210> 29
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Humano
 40 <400> 29
 aaa tct cgg gat ggc agt ggt caa cat ctg gtg
 33
 Lys Ser Arg Asp Gly Ser Gly Gln His Leu Val
 5 10
 45 <210> 30
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Humana
 50 <400> 30
 Lys Ser Arg Asp Gly Ser Gly Gln His Leu Val
 5 10
 <210> 31

ES 2 527 871 T3

<211> 23
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> cebador sintético

<400> 31

10 agcggataac aatttcacac agg
 23

<210> 32
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador sintético

20 <400> 32

gtcgtcttttc cagacgttag t
 21

<210> 33
 25 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <223> enlazador peptídico

<400> 33

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

35

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humano aislado o fragmento del mismo que se une específicamente al receptor del factor 1 de crecimiento similar a la insulina (IGF-IR) que tiene al menos una propiedad seleccionada de
 - (i) inhibe la unión de IGF-I o IGF-II a IGF-IR;
 - (ii) neutraliza la activación de IGF-IR por el IGF-I o IGF-II;
 - (iii) reduce el receptor de la superficie IGF-IR en al menos un 80 %; y
 - (iv) se une al IGF-IR con una K_d de aproximadamente 3×10^{-10} M o menos;
 y tiene una cadena pesada que comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que tienen una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 14 en V_H CDR1, SEC ID N° 16 en V_H CDR2, y SEC ID N° 18 en V_H CDR3;
- 10 y una cadena ligera que comprende CDR que tienen una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 26 en V_L CDR1, SEC ID N° 28 en V_L CDR2, y SEC ID N° 30 en V_L CDR3.
2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, que tiene una región variable en la cadena pesada de SEC ID N° 2 y una región variable en la cadena ligera de la SEC ID N° 10.
- 15 3. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, que tiene todas las propiedades citadas.
4. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo reduce el IGF-IR de superficie en al menos aproximadamente 85 %.
5. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 4, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo reduce el IGF-IR de superficie en al menos aproximadamente 90 %.
- 20 6. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, que se une al IGF-IR con una K_d de aproximadamente 5×10^{-11} M o inferior.
7. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, que inhibe la fosforilación de un sustrato aguas abajo de IGF-IR.
- 25 8. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 7, en el que el sustrato aguas abajo es seleccionado de MAPK, Akt, e IRS-2, y la fosforilación se inhibe en aproximadamente un 50 % o más.
9. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, que estimula la regresión del tumor *in vivo*.
10. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, que estimula la regresión del tumor *in vivo* cuando es administrado con un agente antineoplásico.
- 30 11. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el dominio variable de la cadena pesada tiene una homología de secuencia de al menos un 90 % con la SEC ID N° 2.
12. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el dominio variable de la cadena ligera tiene una homología de secuencia de al menos un 90 % con la SEC ID N° 10.
13. Una composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 14. Un conjugado que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 ligado a un agente citotóxico.
15. Un conjugado que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 ligado a un marcador.
- 40 16. Una composición terapéutica eficaz para inhibir el crecimiento de las células tumorales humanas que expresan IGF-IR y/o estimular la regresión de los tumores que expresan IGF-IR, en la que la composición comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
17. La composición terapéutica de la reivindicación 16, que comprende además un agente anti-neoplásico.
18. La composición terapéutica de la reivindicación 17, en la que el agente antineoplásico es un inhibidor de la topoisomerasa I o de la topoisomerasa II.
- 45 19. La composición terapéutica de la reivindicación 17, en la que el agente antineoplásico es seleccionado de irinotecán, camptotecán y etopósido.

20. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo.
21. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 20, en el que el trastorno proliferativo es seleccionado de acromegalia, neovascularización en la retina y psoriasis.
- 5 22. Un procedimiento *in vitro* para inhibir el crecimiento de una célula que expresa IGF-IR, que comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
23. El procedimiento de la reivindicación 22, que además comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un agente antineoplásico.
- 10 24. El procedimiento de la reivindicación 23, en la que el agente antineoplásico es un inhibidor de la topoisomerasa I o de la topoisomerasa II.
25. El procedimiento de la reivindicación 23, en la que el agente antineoplásico es seleccionado de irinotecán, camptotecán y etopósido.
- 15 26. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en la reducción y/o prevención del crecimiento tumoral o la estimulación de la regresión tumoral.
27. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 26, en el que el uso comprende además administrar una cantidad eficaz de un agente antineoplásico.
28. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 27, en la que el agente antineoplásico es un inhibidor de la topoisomerasa I o de la topoisomerasa II.
- 20 29. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 27, en la que el agente antineoplásico es seleccionado de irinotecán, camptotecán y etopósido.
30. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 29, en el que el tumor es un tumor de mama, tumor colorrectal, tumor de páncreas, tumor de ovario, tumor de pulmón, tumor de próstata, hueso o sarcoma de tejidos blandos o mieloma.
- 25 31. Un inhibidor de la topoisomerasa I o la topoisomerasa II para su uso en la reducción o prevención del crecimiento de un tumor que expresa IGF-IR o estimulación de la regresión de un tumor que expresa IGF-IR en combinación con un anticuerpo humano o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente al IGF-IR y tiene al menos una propiedad seleccionada de:
- (i) inhibe la unión de IGF-I o IGF-II a IGF-IR;
- 30 (ii) neutraliza la activación de IGF-IR por el IGF-I o IGF-II;
- (iii) reduce el receptor de la superficie IGF-IR en al menos un 80 %; y
- (iv) se une al IGF-IR con una Kd de aproximadamente 3×10^{-10} M o menos;
- y tiene una cadena pesada que comprende regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que tienen una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 14 en V_HCDR1, SEC ID N° 16 en V_HCDR2, y SEC ID N° 18 en V_HCDR3;
- 35 y una cadena ligera que comprende CDR que tienen una secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 26 en V_LCDR1, SEC ID N° 28 en V_LCDR2, y SEC ID N° 30 en V_LCDR3.
32. El inhibidor de la topoisomerasa I o la topoisomerasa II para su uso de acuerdo con la reivindicación 31, en el que el inhibidor de la topoisomerasa I o la topoisomerasa II es seleccionado de irinotecán, camptotecán y etopósido.
- 40 33. El inhibidor de la topoisomerasa I o la topoisomerasa II para su uso de acuerdo con la reivindicación 31, en el que el tumor es un tumor de mama, tumor colorrectal, tumor de páncreas, tumor de ovario, tumor de pulmón, tumor de próstata, hueso o sarcoma de tejidos blandos o mieloma.

Figura 1

GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTC	50
GGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTA	100
TCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGG	150
ATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAG	200
AGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGA	250
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGCGCCA	300
TTACGATTTTTGGAGTGGTCCACCCAAGACCACTACTACTACTACTACAT	350
GGACGTCTGGGGCAAAGGGACCACGGTCACCGTCTCAAGC	390

Figura 2

<u>EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV</u> <u>SCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGG</u>	50
<u>IIPFGTANYAQKFGGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED</u> <u>TAVYYCARAP</u>	100
<u>LRFLWSTQDHYHHYMDVWGKGT</u> <u>TVTVSS</u>	130

Figura 3

ATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGT	50
ACATTCAGAGGTCCAGCTGGTGCACTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTG	100
GGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGC	150
TATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGAT	200
GGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACACGCACAGAAGTTCC	250
AGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATG	300
GAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAG	350
AGCGCCATTACGATTTTTGGAGTGGTCCACCCAAGACCACTACTACTACT	400
ACTACATGGACGTCTGGGGCAAAGGGACACGGTCACCGTCTCAAGCGCC	450
TCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCAC	500
CTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCG	550
AACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGAC	600
ACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT	650
GGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG	700
TGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA	750
TCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCAACCGTGCCAGCACCTGAACTCCT	800
GGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCA	850
TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC	900
GAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA	950
TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGG	1000
TGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAG	1050
TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAAC	1100
CATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAACACAGGTGTACACCCTGC	1150
CCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGAGCCTGACCTGCCTG	1200
GTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG	1250
GCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAAGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACG	1300
GCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG	1350
CAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA	1400
CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA	1440

Figura 4

MGWSCIIILFLVATATGVHSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSS	50
YAISWVRQAPGGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYM	100
ELSSLRSEDTAVYYCARAPLRFLEWSTQDHYYYYYMDVWGKGTTVTVSSA	150
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH	200
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK	250
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH	300
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE	350
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL	400
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ	450
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	479

Figura 5

TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGAC	50
AGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTATGCAAGCT	100
GGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCCCTGTACTTGTCTATCTATGGTAAA	150
AACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGG	200
AAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTG	250
ACTATTACTGTAACCTCCCGGGACAACAGTGATAACCGTCTGATATTGGC	300
GGCGGGACCAAGCTGACCGTCCTCAGT	327

Figura 6

SSELTQDPAVSVALGQTVRITC <u>QGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIY</u> <u>GK</u>	50
<u>NNRPS</u> GIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC <u>NSRDNSDNRLI</u> <u>FG</u>	100
GGTKLTVLS	109

Figura 7

ATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGT	50
ACATTCATCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGG	100
GACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTAT	150
GCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCCTGTACTTGTCATCTA	200
TGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCA	250
GCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGAT	300
GAGGCTGACTATTACTGTAACTCCCGGGACAACAGTGATAACCGTCTGAT	350
ATTTGGCGGCGGGACCAAGCTGACCGTCCTCAGTCAGCCCAAGGCTGCCC	400
CCTCGGTCACTCTGTTCCTCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAAACAAG	450
GCCCACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGT	500
GGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCA	550
CACCCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGC	600
CTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCAC	650
GCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTGCAGAATGCTCTT	700
GA	702

Figura 8

MGWSCIILFLVATATGVHSSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYY	50
ASWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAED	100
EADYYCNSRDNSDNRLIFGGGTKLTVLSQPKAAPSVTLFPPSSEELQANK	150
ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLS	200
LTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAECS	233

Figura 9

TCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGAC	50
AGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTATGCAACCT	100
GGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCTATTCTTGTCATCTATGGTGAA	150
AATAAGCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGG	200
AAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCAGAAGATGAGGCTG	250
ACTACTATTGTAAATCTCGGGATGGCAGTGGTCAACATCTGGTGTTCGGC	300
GGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT	327

Figura 10

SSELTQDPAVSVALGQTVRITC QGDSLRSYY ATWYQQKPGQAPILVIYGE	50
NKR PSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCKSRDGS GQHLVFG	100
GGTKLTVLG	109

Figura 11

ATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGT	50
ACATTTCATCTTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGG	100
GACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGCTATTAT	150
GCAACCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCTATTCTTGTCATCTA	200
TGGTGAAAATAAGCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCA	250
GCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCAGAAGAT	300
GAGGCTGACTACTATTGTAAATCTCGGGATGGCAGTGGTCAACATCTGGT	350
GTTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCTGCCC	400
CCTCGGTCACTCTGTTCCTCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAG	450
GCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGT	500
GGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCA	550
CACCCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGC	600
CTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCAC	650
GCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTGCAGAATGCTCTT	700
GA	702

Figura 12

<u>MGWSCIIILFLVATATGVHSSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYY</u>	50
<u>ATWYQQKPGQAPILVIYGENKRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAED</u>	100
<u>EADYYCKSRDGSQHLVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANK</u>	150
<u>ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLS</u>	200
<u>LTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAEC</u>	233

Figura 13

cadena pesada

CDR1	CDR2	CDR3	
SYAIS	GIIPIFGTANYAQKFQG	APLRFLEWSTQDHYYYYYMDV	2F8/A12

cadena ligera

CDR1	CDR2	CDR3	
QGDSLRSYYAS	GKNNRPS	NSRDNSDNRLI	2F8
QGDSLRSYYAT	GENKRPS	KSRDGSQHLV	A12

Figura 14

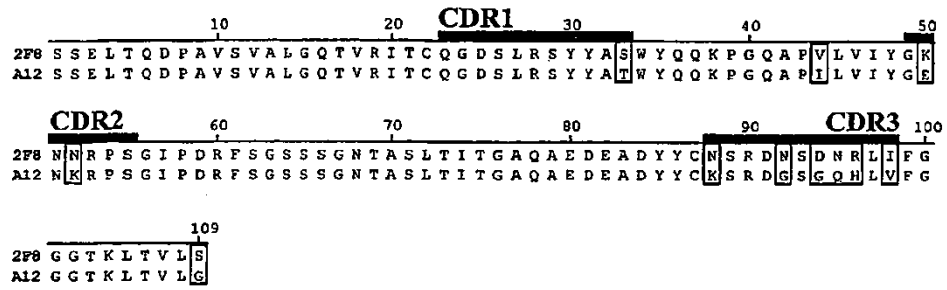


Figura 15

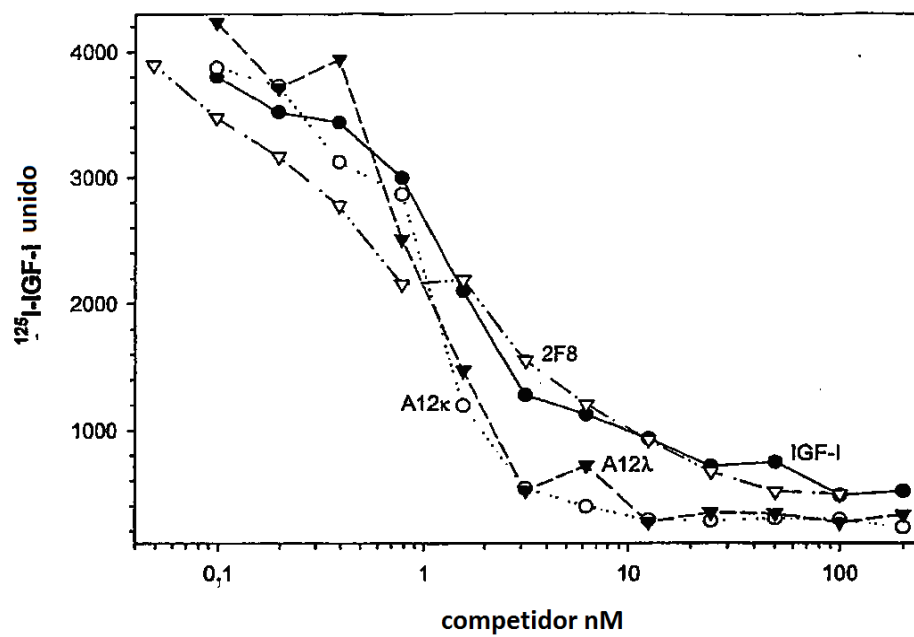


Figura 16

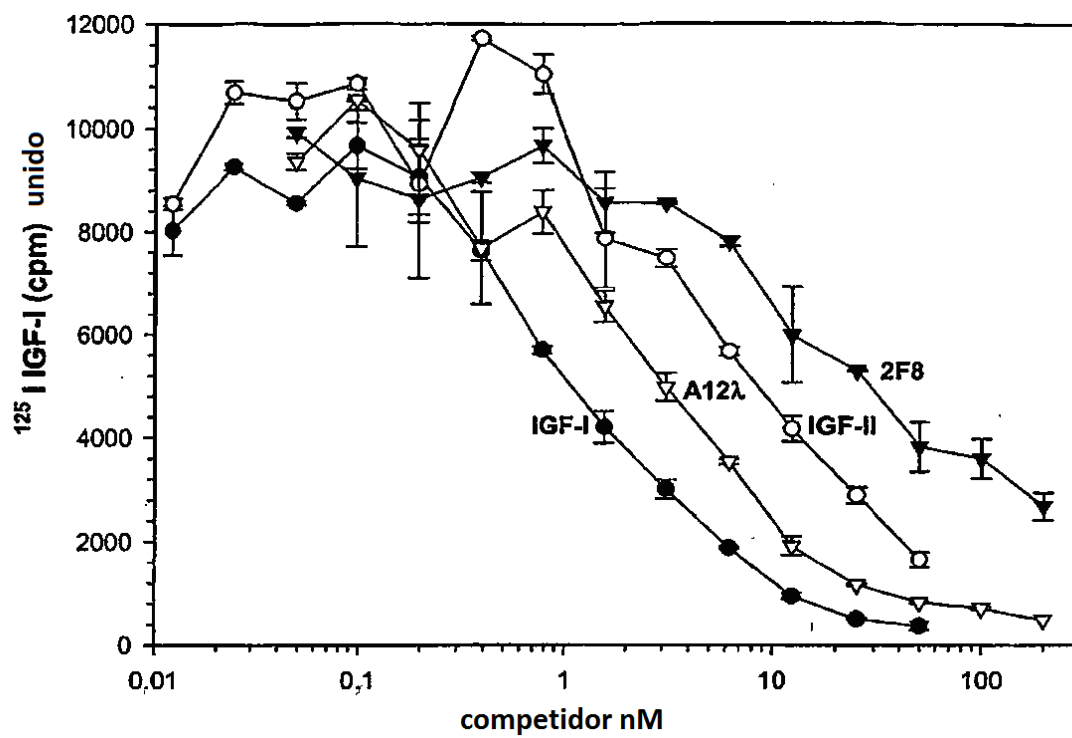


Figura 17

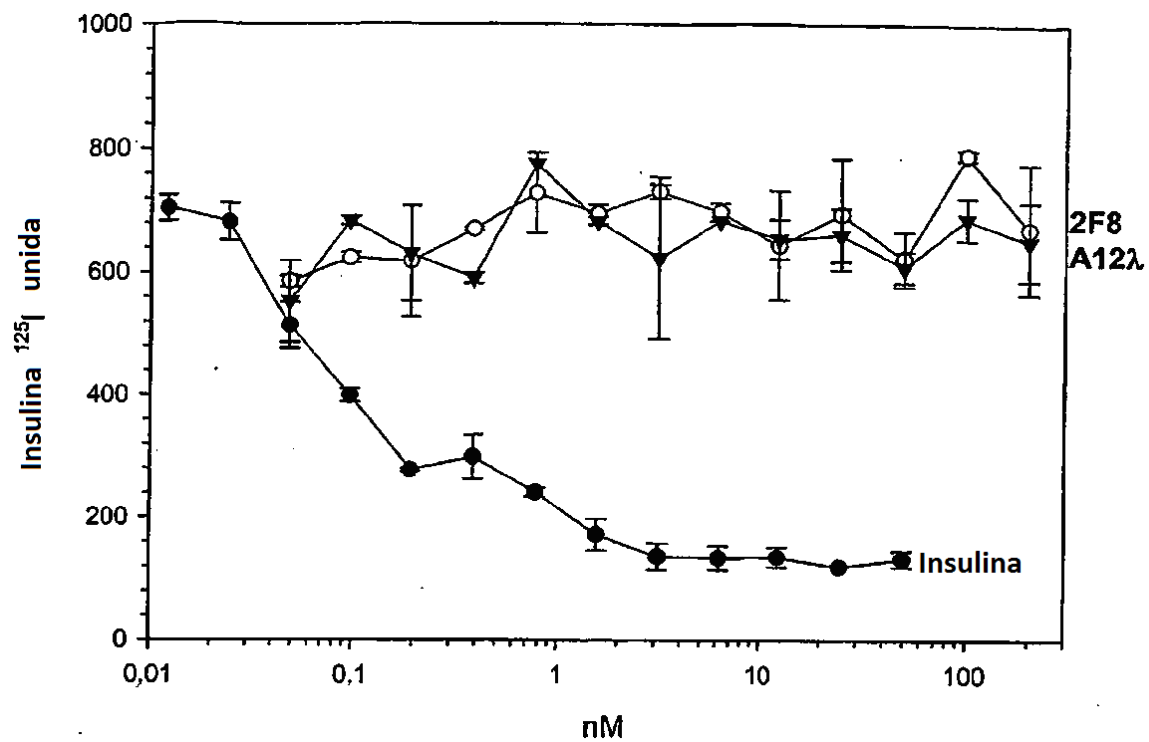


Figura 18A

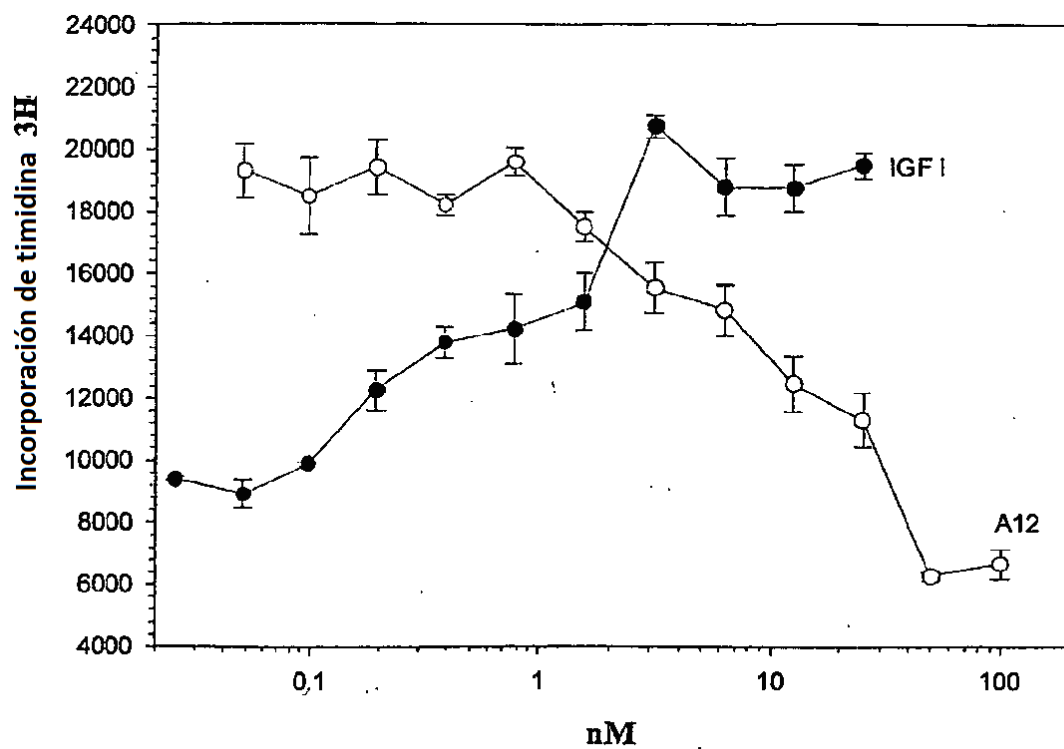


Figura 18B

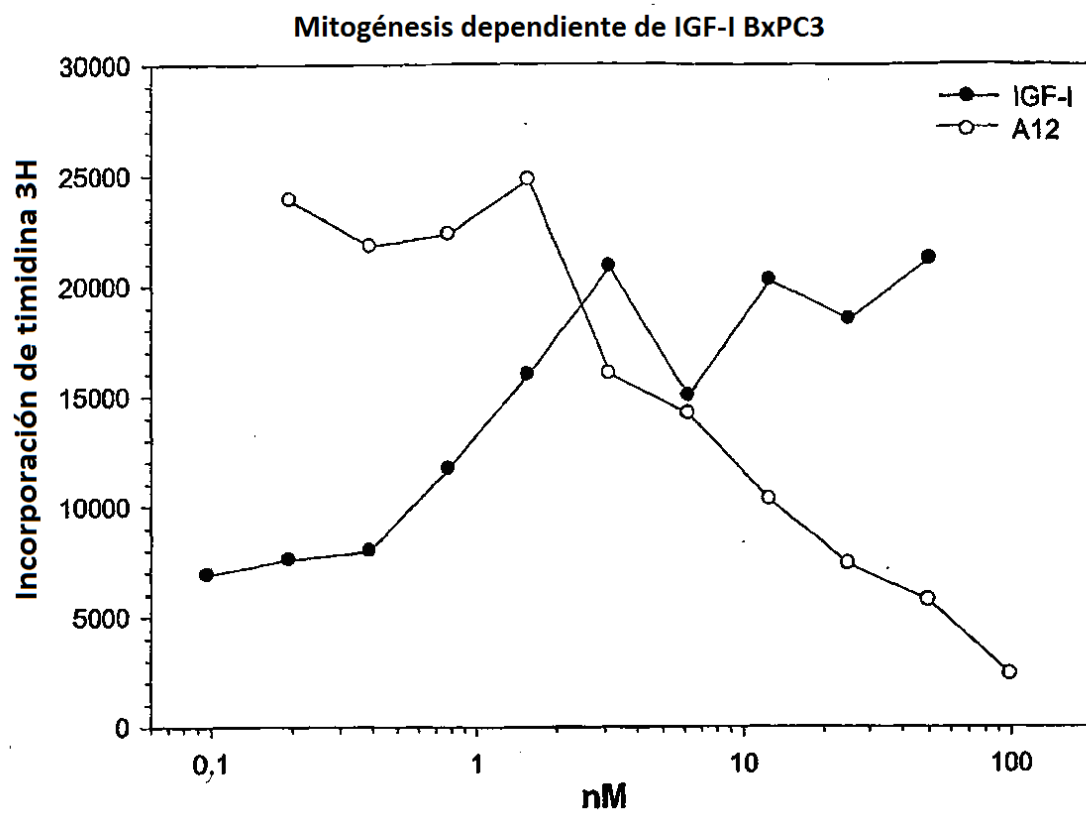


Figura 18C

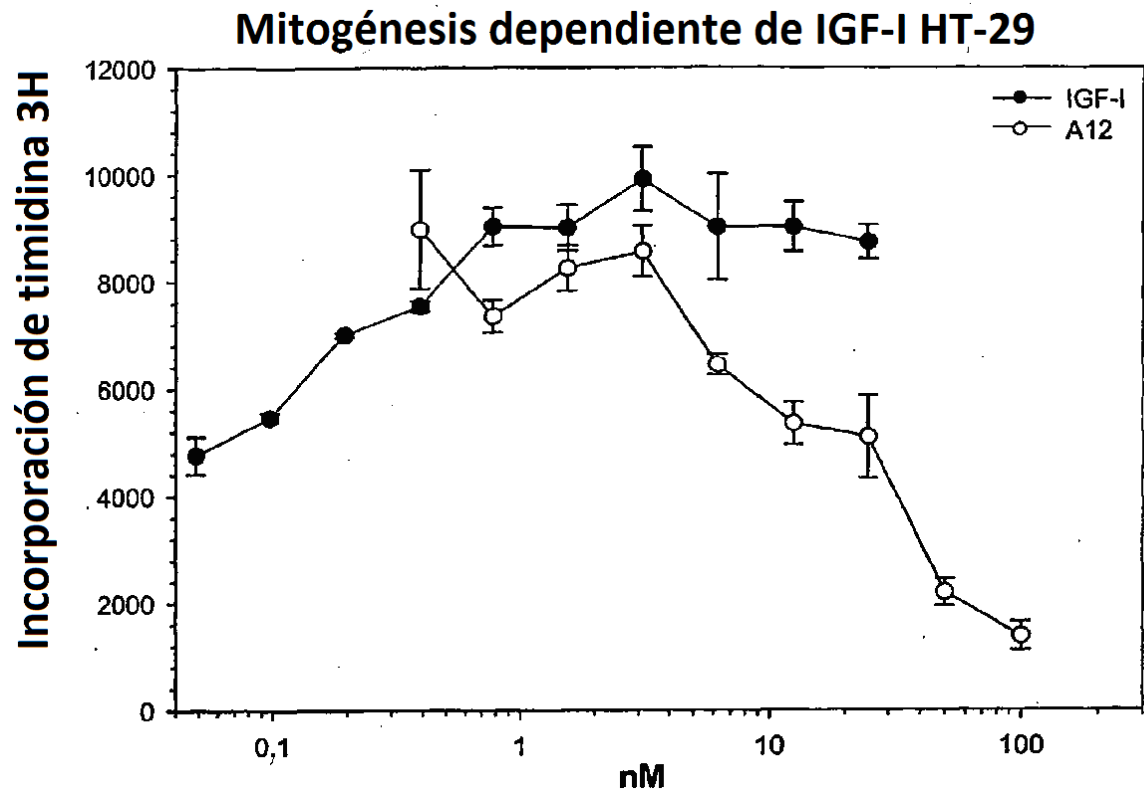


Figura 19A

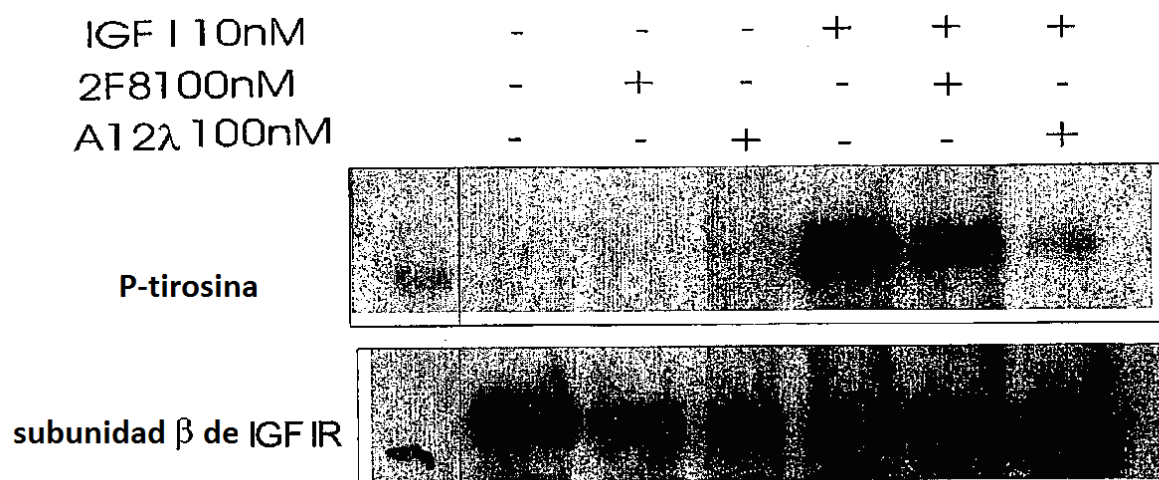


Figura 19B

Fosforilación del receptor de IGF-I dependiente de IFG-I

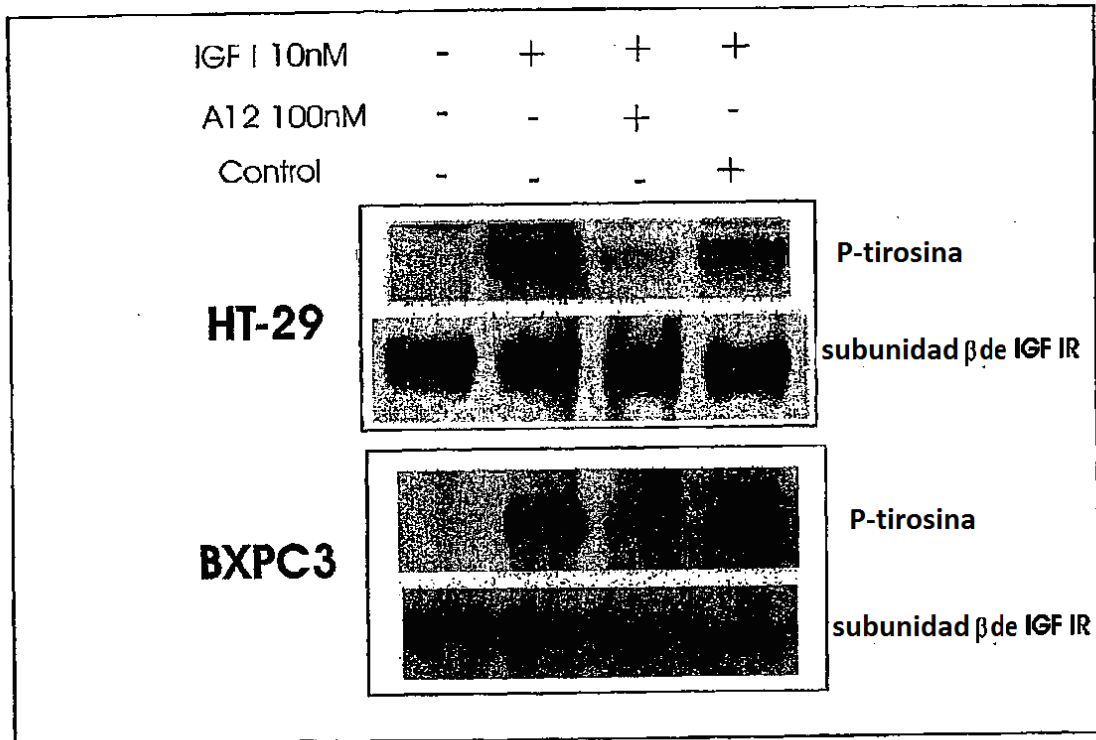


Figura 20A

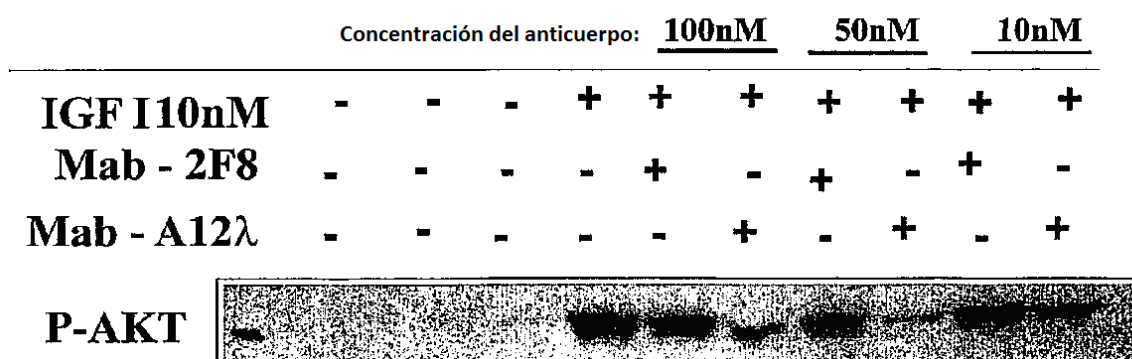
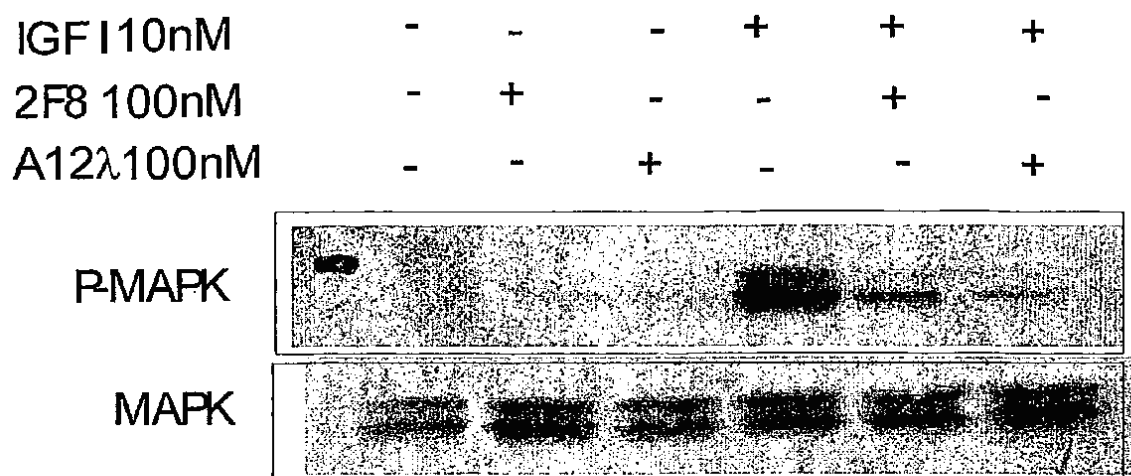


Figura 20B

Figura 21

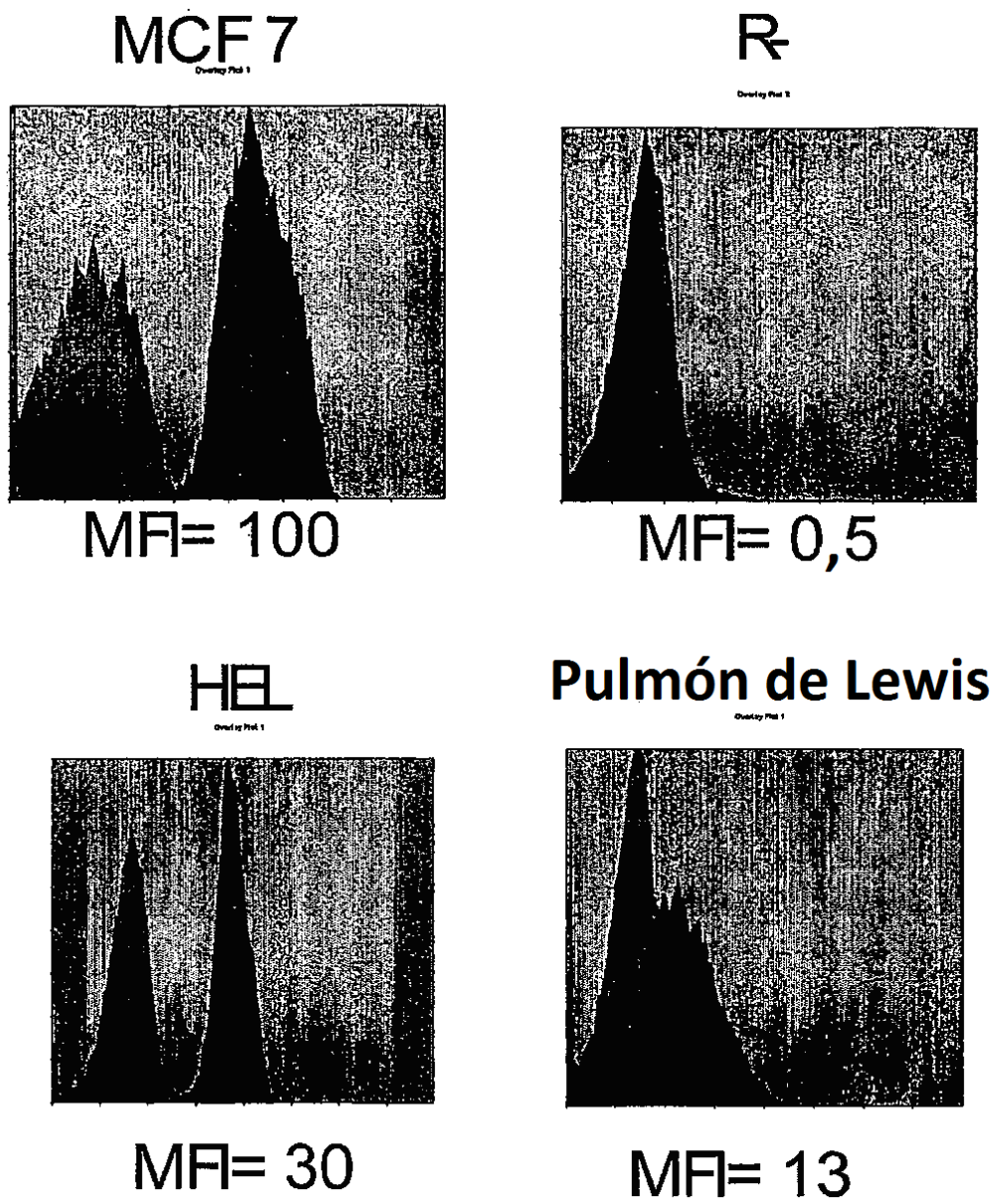


Figura 22A

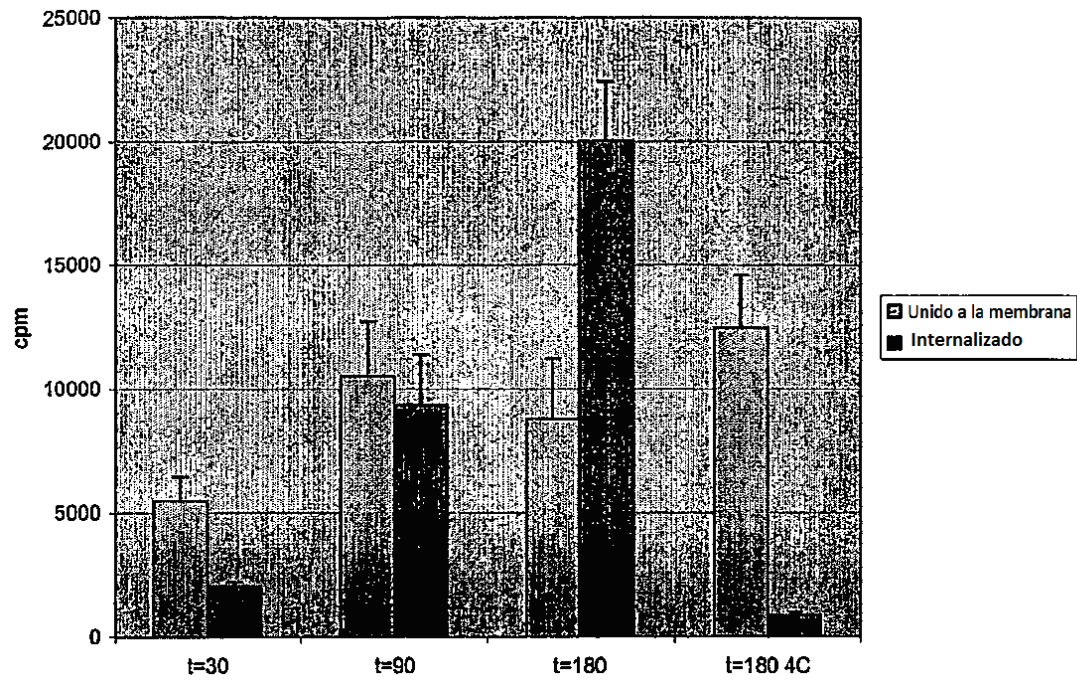


Figura 22B

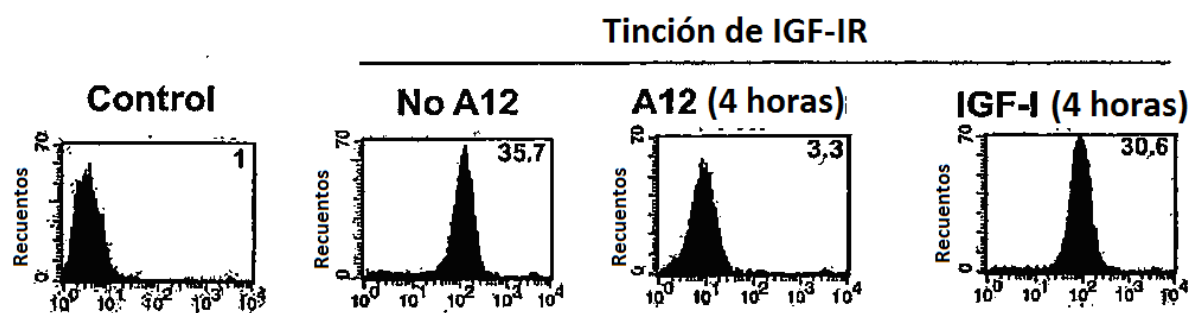


Figura 22C

Degradación del receptor de IGF-I mediada por anticuerpos

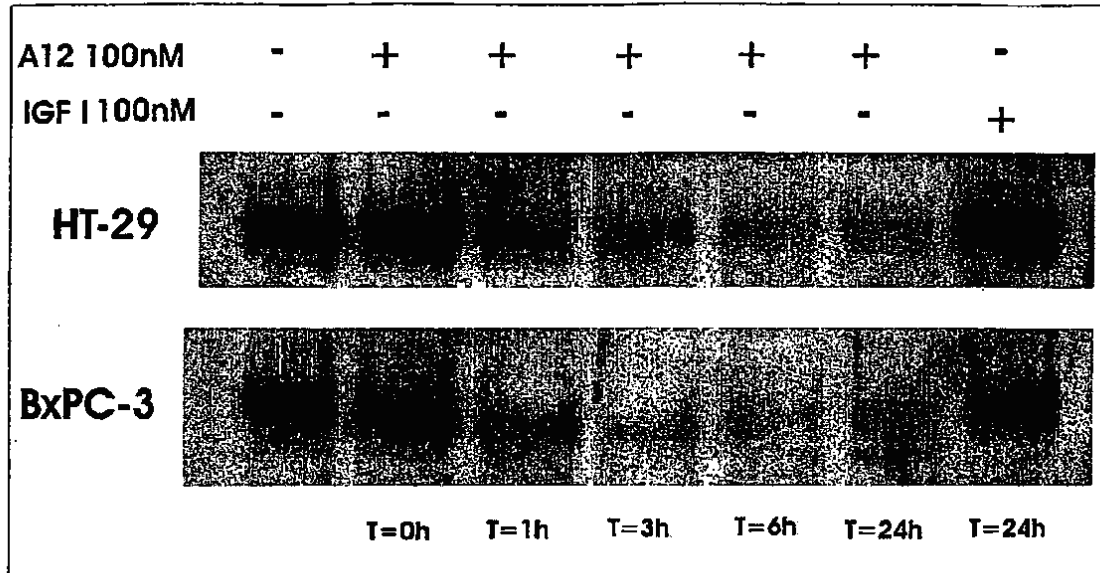


Figura 23

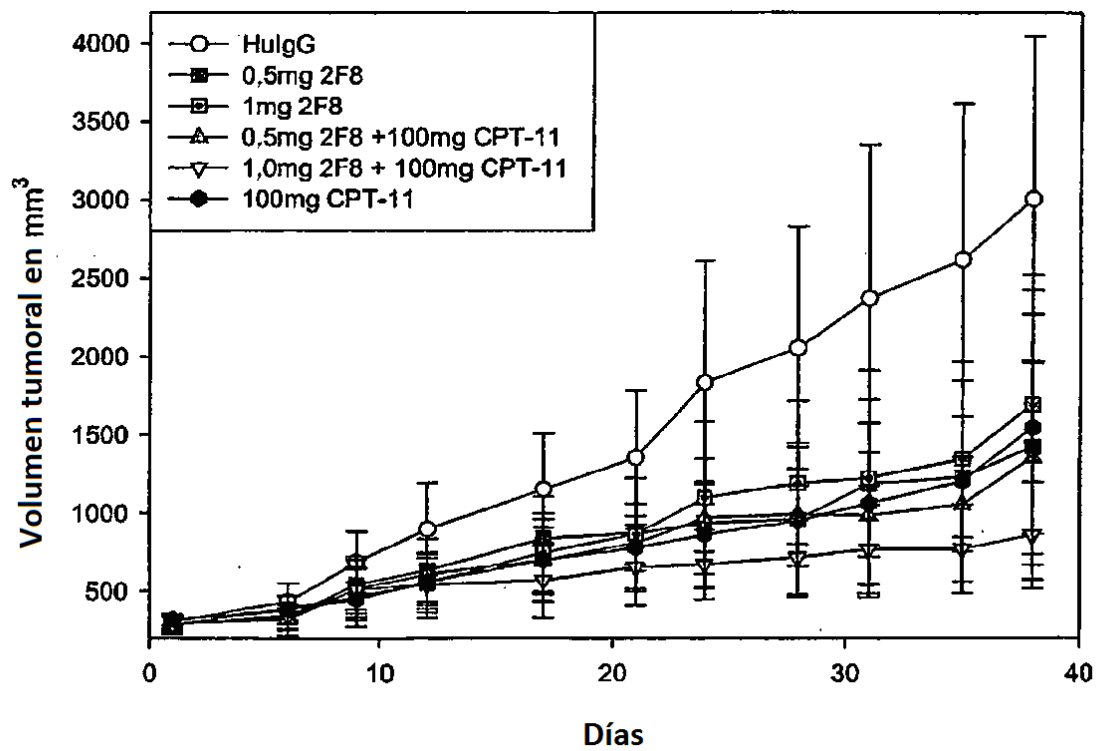


Figura 24

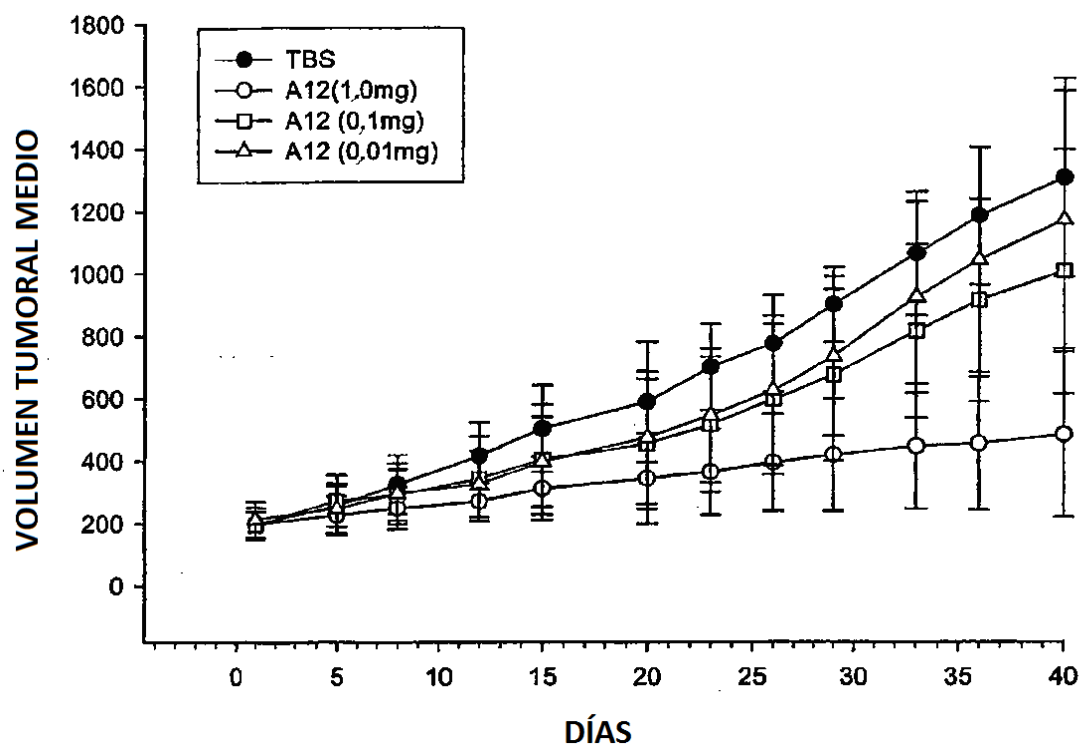


Figura 25

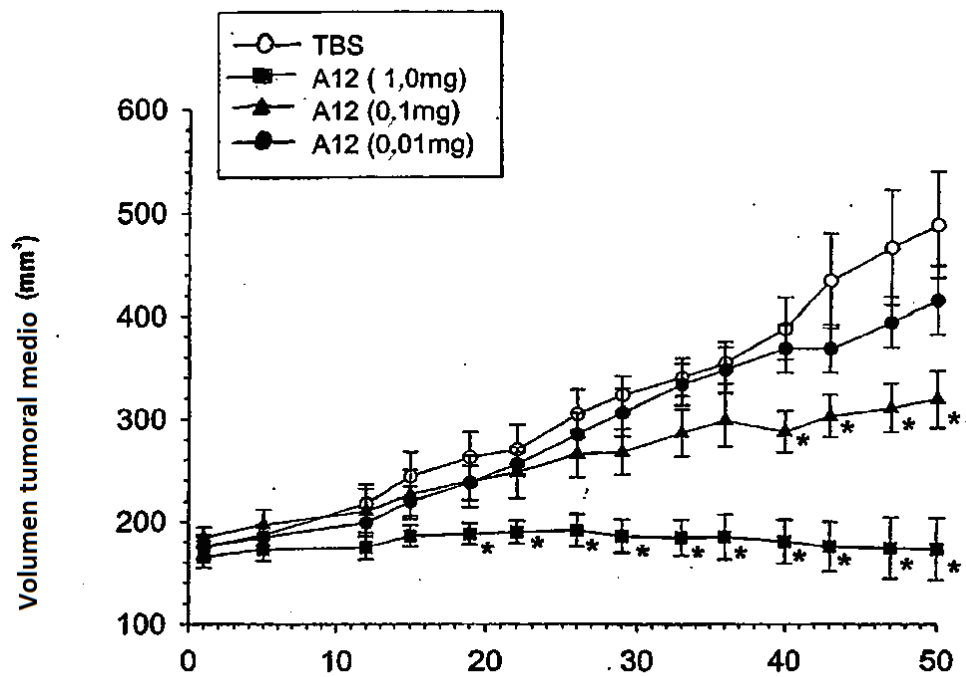


Figura 26

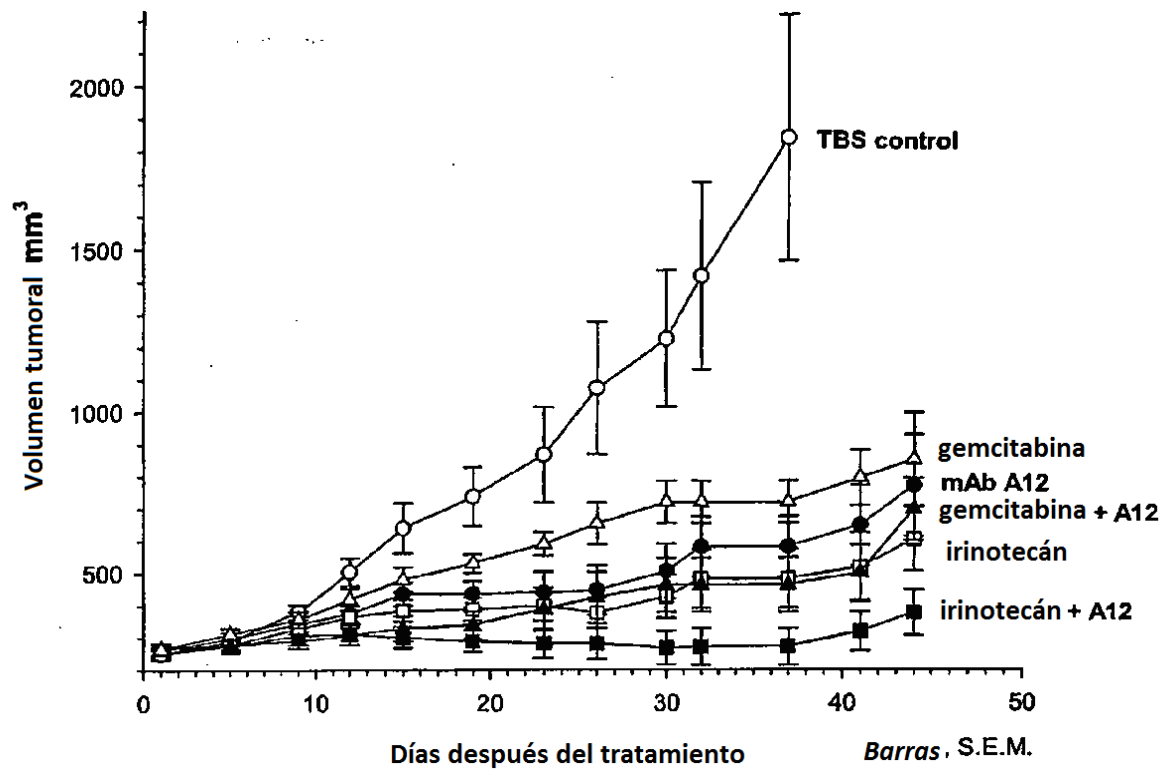


Figura 27

