



Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0116728-6

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0116728-6

(22) Data do Depósito: 20/12/2001

(43) Data da Publicação do Pedido: 11/07/2002

(51) Classificação Internacional: C07K 16/28; A61K 31/138; A61K 31/513; A61K 31/517; A61K 31/704; A61K 39/395; C07K 14/72; C07K 16/30; C07K 16/40; G01N 33/574; A61K 48/00; A61K 39/00; A61P 35/00

(30) Prioridade Unionista: US 60/259,927 de 05/01/2001

(54) Título: ANTICORPOS PARA RECEPTOR DE FATOR DE CRESCIMENTO I SEMELHANTE À INSULINA

(73) Titular: PFIZER INC., Sociedade Norte Americana. Endereço: 235 East 42ND Street - 20TH Floor, New York, N.Y. 10017, ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA(US); AMGEN FREMONT INC., Sociedade Norte-Americana. Endereço: 6701 Kaiser Drive, Fremont CA 94555, ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA(US)

(72) Inventor: BRUCE D. COHEN; JEAN BEEBE; PENELOPE E. MILLER; JAMES D. MOYER; JOSE R. CORVALAN; MICHAEL GALLO

Código de Controle: 57D85B2A9F650E30 997F2D24C2E787C3

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 30/10/2018, observadas as condições legais

Expedida em: 30/10/2018

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "ANTICORPOS PARA RECEPTOR DE FATOR DE CRESCIMENTO I SEMELHANTE À INSULINA".

Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório dos Estados Unidos Nº 60/259.927, depositado em 5 de janeiro de 2001.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) é um polipeptídeo de 7,5 kD que circula no plasma em altas concentrações e é detectável na maioria dos tecidos. IGF-I estimula a diferenciação e a proliferação celular, e é necessário para a maioria dos tipos de células dos mamíferos para manutenção da proliferação. Estes tipos celulares incluem, entre outros, fibroblastos diplóides humanos, células epiteliais, células da musculatura lisa, linfócitos T, células neurais, células mieloides, condrócitos, osteoblastos e células tronco da medula óssea. Para uma revisão da ampla variedade de tipos celulares para os quais a interação IGF-I/receptor de IGF-I media a proliferação celular, ver Goldring et al., Eukar. Gene Express., 1: 31 - 326 (1991).

A primeira etapa no caminho de transdução levando a proliferação ou diferenciação celular estimulada por IGF-I é ligação de IGF-I ou IGF-II (ou insulina em concentrações suprafisiológicas) ao receptor de IGF-I. O receptor de IGF-I é composto de dois tipos de subunidades: uma subunidade alfa (uma proteína de 130 - 135 kD que é inteiramente extracelular e funciona na ligação de ligante) e uma subunidade beta (uma proteína transmembrana de 95 kD, com domínios citoplasmáticos e transmembrana). O IGF-IR pertence à família de receptores de fator de crescimento de tirosina quinase (Ullrich et al., Cell 61: 203 - 212, 1990), e é estruturalmente semelhante ao receptor de insulina (Ullrich et al., EMBO J. 5: 2503 - 2512, 1986). O IGF-IR é inicialmente sintetizado como um polipeptídeo pró-receptor de cadeia única que é processado por glicosilação, clivagem proteolítica, e ligação covalente para reunir em um heterotetrâmero de 460 kD maduro compreendendo duas subunidades alfa e duas subunidades beta. A subunidade(s) beta possui(em) atividade de tirosina quinase ativada por ligante. Esta atividade está

implicada nos caminhos de sinalização mediando a ação de ligante que envolvem autofosforilação da subunidade beta e fosforilação dos substratos de IGF-IR.

In vivo, os níveis de soro de IGF-I são dependentes da presença de hormônio do crescimento pituitária (GH). Embora o fígado seja um local importante da síntese de IGF-I GH-dependente, pesquisa recente indica que a maioria dos tecidos normais também produz IGF-I. Uma variedade de tecidos neoplásicos também podem produzir IGF-I. Portanto IGF-I pode agir como um regulador da proliferação celular normal e anormal através de mecanismos autócrinos ou parácrinos, bem como endócrinos. IGF-I e IGF-II ligam as proteínas de ligação de IGF (IGFBPs) *in vivo*. A disponibilidade de IGF livre para interação com o IGF-IR é modulada pelas IGFBPs. Para uma revisão de IGFBPs e IGF-I, ver Grimberg et al., *J. Cell. Physiol.* 183: 1 - 9, 2000.

Isto é evidência considerável para um papel para IGF-I e/ou IGF-IR na manutenção de células tumorais *in vitro* e *in vivo*. Os níveis de IGF-IR estão elevados em tumores dos pulmões (Kaiser et al., *J. Cancer Res. Clin Oncol.* 119: 665 - 668, 1993; Moody et al., *Life Sciences* 52: 1161 - 1173, 1993; Macauley et al., *Cancer Res.*, 50: 2511 - 2517, 1990), de mama (Polak et al., *Cancer Lett.* 38: 223 - 230, 1987; Fockens et al., *Cancer Res.* 49: 7002 - 7009, 1989; Cullen et al., *Cancer Res.* 49: 7002 - 7009, 1990; Arteaga et al., *J. Clin. Invest.* 84: 1418 - 1423, 1989), da próstata e do cólon (Remaole-Bennet et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75: 609 - 616, 1992; Guo et al., *Gastroenterol.* 102: 1101 - 1108, 1992). A expressão desregulada de IGF-I no epitélio da próstata leva à neoplasia em camundongos transgênicos (DiGiovanni et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 3455 - 60, 2000). Além disso, IGF-I parece ser um estimulador autócrino de gliomas humanos (Sandberg-Nordqvist et al., *Cancer Res.* 53: 2475 - 2478, 1993), ao passo que IGF-I estimulou o crescimento de fibrossarcomas que superexpressaram IGF-IR (Butler et al., *Cancer Res.* 58: 3021 - 27, 1998). Além disso, indivíduos com níveis de IGF-I "normais elevados" têm um maior risco de cânceres comuns em comparação com indivíduos com níveis de IGF-I na faixa de

P10116728

"normal baixo" (Rosen et al., Trends Endocrinol. Metab. 10: 136 - 41, 1999).

Muitos destes tipos de células tumorais respondem a IGF-I com um sinal proliferativo em cultura (Nakanishi et al., J. Clin. Invest. 82: 354 - 359, 1988;

Freed et al., J. Mol. Endocrinol. 3: 509 - 514, 1989), e foram postuladas alças

5 autócrinas ou parácrinas para proliferação *in vivo* (LeRoith et al., Endocrine Revs. 16: 143 - 163, 1995; Yee et al., Mol. Endocrinol. 3: 509 - 514, 1989).

Para uma revisão do papel que a interação IGF-I/receptor de IGF-I desempenha no crescimento de uma variedade de tumores humanos, ver Macaulay, Br. J. Cancer, 65: 311 - 320, 1992.

10 Níveis aumentados de IGF-I também se correlacionam com vários estados patológicos não-cancerosos, inclusive acromegalia e gigantismo (Barkan, Cleveland Clin. J. Med, 65: 343, 347 - 349, 1998), ao passo que a função anormal IGF-I/ receptor de IGF-I foi implicada na psoríase (Wright et al., Nat. Biotech. 18: 521 - 526, 2000), aterosclerose e restenose do músculo

15 liso de vasos sanguíneos após angioplastia (Bayes-Genis et al., Circ. Res. 86: 125 - 130, 2000). Níveis aumentados de IGF-I também podem ser um problema no diabetes ou em complicações do mesmo, tais como proliferação microvascular (Smith et al., Nat. Med. 5: 1390 - 1395, 1999). Níveis reduzidos de IGF-I, que ocorrem, entre outros, em casos quando os níveis de

20 soro de GH são reduzidos ou quando há uma insensibilidade ou resistência a GH, estão associados com distúrbios tais como baixa estatura (Laron, Pediatr. Drugs 1: 155 - 159, 1999), neuropatia, redução da massa muscular e osteoporose (Rosen et al., Trends Endocrinol. Metab. 10: 136 - 141, 1999).

Usando vetores de expressão anti-sentido ou oligonucleotídeos 25 anti-sentido para o RNA de IGF-IR, foi mostrado que a interferência com IGF-IR leva à inibição do crescimento celular mediado por IGF-I ou mediado por IGF-II (ver, por exemplo, Wright et al., Nat. Biotech. 18: 521 - 526, 2000). A estratégia anti-sentido teve sucesso na inibição da proliferação celular em vários tipos de células normais e em linhagens de células de tumores humanos. O crescimento também pode ser inibido usando análogos de peptídeos de IGF-I (Pietrzkowski et al., Cell Growth & Diff. 3: 199 - 205, 1992; e Pietrzkowski et al., Mol. Cell. Biol., 12: 3883 - 3889, 1992), ou um

vetor expressando um RNA anti-sentido para o RNA de IGF-I (Trojan et al., Science 259: 94 - 97, 1992). Além disso, anticorpos para IGF-IR (Arteaga et al., Breast Canc. Res. Treatm., 22: 101 - 106, 1992; e Kalebic et al., Cancer Res. 54: 5531 - 5534, 1994), e mutantes dominantes negativos de IGF-IR (Prager et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 2181 - 2185, 1994; Li et al., J. Biol. Chem., 269: 32558 - 32564, 1994 e Jiang et al., Oncogene 18: 6071 - 77, 1999), podem reverter o fenótipo transformado, inibir a tumorigênese, e induzir a perda do fenótipo metastático.

IGF-I também é importante na regulação da apoptose. A apoptose, que é morte celular programada, está envolvida em uma ampla variedade de processos de desenvolvimento, inclusive maturação do sistema imune e nervoso. Além deste papel no desenvolvimento, a apoptose também foi implicada como uma importante proteção celular contra tumorigênese (Williams, Cell 65: 1097 - 1098, 1991; Lane, Nature 362: 786 - 787, 1993). A supressão do programa apoptótico, por uma variedade de lesões genéticas, pode contribuir para o desenvolvimento e a progressão de malignidades.

IGF-I protege contra apoptose induzida pela retirada de citocina em células hematopoiéticas IL-3-dependentes (Rodriguez-Tarduchy, G. et al., J. Immunol. 149: 535 - 540, 1992), e da retirada de soro em células Rat-1/mycER (Harrington, E., et al., EMBO J. 13: 3286 - 3295, 1994). A função antiapoptótica de IGF-I é importante no estágio pós-compromisso do ciclo celular e também em células bloqueadas na progressão do ciclo celular por etoposídeo ou timidina. A demonstração de que fibroblastos orientados por c-myc são dependentes de IGF-I para sua sobrevivência sugere que há importante papel para o IGF-IR na manutenção de células tumorais especificamente inibindo apoptose, um papel distinto dos efeitos proliferativos de IGF-I ou IGF-IR. Este seria semelhante a um papel que seria desempenhado por outros genes antiapoptóticos tais como bcl-2 na estimulação da sobrevivência dos tumores (McDonnell et al., Cell 57: 79 - 88, 1989; Hockenberry et al., Nature 348: 334 - 336, 1990).

Os efeitos protetores de IGF-I sobre a apoptose são dependentes de ter IGF-IR presente nas células para interagir com IGF-I (Resnicoff et

al., Cancer Res. 55: 3739 - 3741, 1995). O suporte para uma função antia apoptótica de IGF-IR na manutenção de células tumorais foi também proporcionado por um estudo usando oligonucleotídeos anti-sentido para o IGF-IR que identificaram uma relação quantitativa entre os níveis de IGF-IR, o grau 5 de apoptose e o potencial tumorigênico de um tumor singêntico de rato (Resnickoff et al., Cancer Res. 55: 3739 - 3741, 1995). Foi visto que um IGF-IR superexpresso protege células tumorais *in vitro* contra apoptose induzida por etoposídeo (Sell et al., Cancer Res. 55: 303 - 306, 1995) e, de modo ainda mais dramático, que uma redução nos níveis de IGF-IR abaixo dos níveis 10 selvagens provocaram massiva apoptose de células tumorais *in vivo* (Resnickoff et al., Cancer Res. 55: 2463 - 2469, 1995).

Estratégias potenciais para induzir apoptose ou para inibir a proliferação celular associada com aumento dos níveis de IGF-I, aumento dos níveis de IGF-II e/ou aumento dos níveis de receptor IGF-IR incluem suprimir 15 os níveis de IGF-I ou os níveis de IGF-II ou evitar a ligação de IGF-I ao IGF-IR. Por exemplo, foi empregado o octreotídeo análogo de somatostatina de longa ação para reduzir a síntese e/ou secreção de IGF. Foi usado IGF-IR solúvel para induzir apoptose em células tumorais *in vivo* e para inibir a tumorigênese em um sistema de animal experimental (D'Ambrosio et al., Cancer Res. 56: 4013 - 20, 1996). Além disso, oligonucleotídeos anti-sentido 20 IGF-IR , análogos de peptídeos de IGF-I, e anticorpos para IGF-IR foram usados para reduzir a expressão de IGF-I ou IGF-IR (ver acima). No entanto, nenhum destes compostos foi adequado para administração de longa duração a pacientes humanos. Além disso, embora IGF-I tenha sido administrado 25 a pacientes para tratamento da baixa estatura, osteoporose, redução da massa muscular, neuropatia ou diabetes, a ligação de IGF-I a IGFBPs tem freqüentemente tornado o tratamento com IGF-I difícil ou ineficaz.

Por conseguinte, em vista dos papéis que IGF-I e IGF-IR têm em distúrbios tais como câncer e outros distúrbios proliferativos quando IGF-I 30 e/ou IGF-IR são superexpressos, e os papéis que muito pouco IGF-I e IGF-IR têm em tais distúrbios tais como baixa estatura e fraquesa quando ou IGF-I e/ou IGF-IR são subexpressos, seria desejável produzir anticorpos

810316738

para IGF-IR que possam ser usados para ou inibir ou estimular IGF-IR. Embora tenha sido relatado que foram encontrados anticorpos anti-IGF-IR em alguns pacientes com doenças auto-imunes, nenhum destes anticorpos foi purificado e não foi demonstrado que nenhum seja adequado para inibir a atividade de IGF-I para fins diagnósticos ou clínicos. Ver, por exemplo, Thompson et al., Pediat. Res. 32: 455 - 459, 1988; Tappy et al., Diabetes 37: 1708 - 1714, 1988; Weightman et al., Autoimmunity 16: 251 - 257, 1993; Drexhage et al., Nether. J. of Med. 45: 285 - 293, 1994. Portanto, seria desejável obter anticorpos anti-IGF-IR humanos de alta afinidade que possam ser usados para tratar doenças em seres humanos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

As Figuras 1A-1C mostram alinhamentos das seqüências de nucleotídeos das regiões variáveis de cadeia leve de seis anticorpos anti-IGF-IR humanos umas às outras e para seqüências da linhagem-germinativa ("germline"). A Figura 1A mostra o alinhamento das seqüências de nucleotídeos da região variável da cadeia leve (VL) de anticorpos 2.12.1 (SEQ ID NO: 1) 2.13.2 (SEQ ID NO: 5), 2.14.3 (SEQ ID NO: 9) e 4.9.2 (SEQ ID NO: 13) umas às outras e para a seqüência da linhagem-germinativa V κ A30 (SEQ ID NO: 39). A Figura 1B mostra o alinhamento da seqüência de nucleotídeos de VL do anticorpo 4.17.3 (SEQ ID NO: 17) para a seqüência da linhagem-germinativa ("germline") V κ O12 (SEQ ID NO: 41). A Figura 1C mostra o alinhamento da seqüência de nucleotídeos de VL do anticorpo 6.1.1 (SEQ ID NO: 21) para a seqüência da linhagem-germinativa ("germline") V κ A27 (SEQ ID NO: 37). Os alinhamentos também mostram as regiões CDR do VL de cada anticorpo. As seqüências de consenso para as Figuras 1A-1C são mostradas na SEQ ID NOS: 53 - 55, respectivamente.

As Figuras 2A-2D mostram alinhamentos das regiões variáveis das seqüências de nucleotídeos da cadeia pesada de seis anticorpos anti-IGF-IR humanos umas às outras e para seqüências de aminoácidos. A Figura 2A mostra o alinhamento da seqüência de nucleotídeos do VH do anticorpo 2.12.1 (SEQ ID NO: 3) para a seqüência da linhagem-germinativa ("germline") VH DP-35 (SEQ ID NO: 29). A Figura 2B mostra o alinhamento da

seqüência de nucleotídeos do VH do anticorpo 2.14.3 (SEQ ID NO: 11) para a seqüência da linhagem-germinativa ("germline") VIV-4/4.35 (SEQ ID NO: 43). As Figuras 2C-1 e 2C-2 mostram os alinhamentos das seqüências de nucleotídeos do VH de anticorpos 2.13.2 (SEQ ID NO: 7), 4.9.2 (SEQ ID NO: 15) e 6.1.1 (SEQ ID NO: 23) umas às outras e para a seqüência da linhagem-germinativa ("germline") VH DP-47 (SEQ ID NO: 31). As Figuras 2D mostra o alinhamento da seqüência de nucleotídeos do VH do anticorpo 4.17.3 (SEQ ID NO: 19) para a seqüência da linhagem-germinativa ("germline") VH DP-71 (SEQ ID NO: 35). O alinhamento também mostra as regiões CDR dos anticorpos. As seqüências de consenso para as Figuras 2A-2D são mostradas na SEQ ID NOS: 56-59, respectivamente.

A Figura 3 mostra que anticorpos anti-IGF-IR 2.13.2, 4.9.2 e 2.12.1 inibem a ligação de IGF-I a células 3T3-IGF-IR.

A Figura 4 mostra que anticorpo anti-IGF-IR 4.9.2 inibe a fosforilação de tirosina de receptor induzida por IGF-I (painel superior) e induz a baixa-regulação de IGF-IR na superfície celular (painel inferior).

A Figura 5 mostra que anticorpos anti-IGF-IR 2.13.2 e 4.9.2 reduzem o sinal de fosfotirosina de IGF-IR em tumores de 3T3-IGF-IR.

A Figura 6 mostra que anticorpos anti-IGF-IR 2.13.2 e 4.9.2 reduzem IGF-IR em tumores de 3T3-IGF-IR.

A Figura 7 mostra que anticorpo anti-IGF-IR 2.13.2 inibe o crescimento de tumor de 3T3-IGF-IR *in vivo* sozinho (painel da esquerda) ou em combinação com adriamicina (painel da direita).

A Figura 8 mostra a relação entre os níveis de soro de anticorpo anti-IGF-IR 2.13.2 e a baixa-regulação de IGF-IR em tumores de 3T3-IGF-IR.

A Figura 9 mostra que múltiplas doses do anticorpo anti-IGF-IR 2.13.2 inibem o crescimento de tumor de 3T3-IGF-IR *in vivo* sozinho ou em combinação com adriamicina.

A Figura 10 mostra que o anticorpo anti-IGF-IR 2.13.2 inibe o crescimento de grandes tumores *in vivo* em combinação com adriamicina.

A Figura 11 mostra que o anticorpo anti-IGF-IR 2.13.2 inibe o

crescimento de tumor Colo 205 *in vivo* sozinho ou em combinação com 5-deoxiuridina (5-FU).

A Figura 12 mostra que múltiplas doses do anticorpo anti-IGF-IR 2.13.2 inibem o crescimento de tumor Colo 205 *in vivo* sozinho ou em combinação com 5-FU.

A Figura 13 mostra que múltiplas doses do anticorpo anti-IGF-IR 2.13.2 inibem o crescimento de tumor MCF-7 *in vivo* sozinho ou em combinação com taxol.

A Figura 14 mostra que o anticorpo anti-IGF-IR 2.13.2 inibe o crescimento de tumor MCF-7 *in vivo* sozinho (painel da esquerda) ou em combinação com adriamicina (painel da direita).

A Figura 15 mostra que múltiplas doses do anticorpo anti-IGF-IR 2.13.2 inibem o crescimento de tumor MCF-7 *in vivo* sozinho ou em combinação com tamoxifen.

A Figura 16 mostra que múltiplas doses do anticorpo anti-IGF-IR 2.13.2 inibem o crescimento de tumor A431 *in vivo* sozinho ou em combinação com o inibidor de tirosina quinase receptor de fator de crescimento epidérmico (EGF-R) CP-358.774.

A Figura 17 mostra uma avaliação farmacocinética de uma única injeção intravenosa do anticorpo anti-IGF-IR 2.13.2 em macacos Cynomolgus.

A Figura 18 mostra que a combinação do anticorpo anti-IGF-IR 2.13.2 e adriamicina aumenta a baixa-regulação de IGF-IR em tumores 3T3-IGF-IR *in vivo*.

A Figura 19A mostra o número de mutações em diferentes regiões das cadeias pesadas e leves de 2.13.2 e 2.12.1 comparadas às seqüências da linhagem-germinativa ("germline").

As Figuras 19A-D mostram alinhamentos das seqüências de aminoácidos das cadeias pesadas e leves dos anticorpos 2.13.2 e 2.12.1 com as seqüências da linhagem-germinativa ("germline") das quais são derivadas. A Figura 19B mostra um alinhamento da seqüência de aminoácidos da cadeia pesada do anticorpo 2.13.2 (SEQ ID NO: 45) com a seqüência de

linhagem-germinativa ("germline") DP-47(3-23)/D6-19/JH6 (SEQ ID NO: 46). A Figura 19C mostra um alinhamento da seqüência de aminoácidos da cadeia leve de anticorpo 2.13.2 (SEQ ID NO: 47) com a da seqüência de linhagem-germinativa ("germline") A30/Jk2 (SEQ ID NO: 48). A Figura 19D mostra um alinhamento da seqüência de aminoácidos da cadeia pesada do anticorpo 2.12.1 (SEQ ID NO: 49) com a da seqüência de linhagem-germinativa ("germline") DP-35(3-11)/D3-3/JH6 (SEQ ID NO: 50). A Figura 19E mostra um alinhamento da seqüência de aminoácidos da cadeia leve de anticorpo 2.12.1 (SEQ ID NO: 51) com a da seqüência de aminoácidos A30/Jk1(SEQ ID NO: 52). Para as Figuras 19B-E, as seqüências de sinal estão em itálico, as CDRs estão sublinhadas, os domínios constantes estão em negrito, as mutações de estrutura (FR) estão ressaltadas com um sinal de mais ("+") acima do resíduo aminoácido e as mutações de CDR estão ressaltadas com um asterisco acima do resíduo aminoácido.

15 **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

A presente invenção fornece um anticorpo isolado ou porção de ligação de antígeno do mesmo que liga IGF-IR, preferencialmente um que liga um IGF-IR de primata e humano, e mais preferencialmente um que é um anticorpo humano. A invenção fornece um anticorpo anti-IGF-IR que inibe a ligação de IGF-I ou IGF-II a IGF-IR, e também fornece um anticorpo anti-IGF-IR que ativa IGF-IR.

20 A invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo e um veículo farmaceuticamente aceitável. A composição farmacêutica pode ainda compreender outro componente, tais como um agente antitumoral ou um reagente para estudo por imagens.

25 Métodos diagnósticos e terapêuticos são também fornecidos pela invenção. Métodos diagnósticos incluem um método para diagnosticar a presença ou a localização de um tecido expressando IGF-IR usando um anticorpo anti-IGF-IR. Um método terapêutico compreende administrar o anticorpo a um indivíduo que necessite do mesmo, preferencialmente em conjunto com a administração de outro agente terapêutico.

30 A invenção fornece uma linhagem celular isolada, tal como um

hibridoma, que produz um anticorpo anti-IGF-IR.

A invenção também fornece moléculas de ácidos nucléicos codificando as porções dos mesmos de ligação de antígeno de cadeia pesada e/ou de cadeia leve de um anticorpo anti-IGF-IR. A invenção fornece vetores e células hospedeiras compreendendo as moléculas de ácido nucléico, bem como métodos para produzir de modo recombinante os polipeptídeos codificados pelas moléculas de ácidos nucléicos.

Também são fornecidos animais transgênicos não-humanos que expressam as porções dos mesmos de ligação de antígeno de cadeia pesada e/ou de cadeia leve de um anticorpo anti-IGF-IR. A invenção também fornece um método para tratar um indivíduo que necessite do mesmo com uma

quantidade eficaz de uma molécula de ácido nucléico codificando as porções dos mesmos de ligação de antígeno de cadeia pesada e/ou de cadeia leve de um anticorpo anti-IGF-IR.

15 **DESCRÍÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

Definições e Técnicas Gerais

A menos que definido de outro modo neste relatório, os termos científicos e técnicos usados em conexão com a presente invenção devem ter os significados que são entendidos comumente por aqueles versados na

20 técnica. Além disso, a menos que requerido de outro modo pelo contexto, termos singulares devem incluir pluralidades e termos plurais devem incluir o singular. De modo geral, nomenclaturas usadas em conexão com, e técnicas de, cultura celular e de tecido, biologia molecular, imunologia, microbiologia, genética e química de proteínas e de ácidos nucléicos e hibridização des-

25 critas neste relatório são de conhecimento geral e usadas comumente na técnica. Os métodos e técnicas da presente invenção são geralmente realizados de acordo com métodos convencionais de conhecimento geral na técnica e como descritos em várias referências gerais e mais específicas que são citadas e discutidas do início ao fim do presente relatório descriptivo a

30 menos que indicado de outro modo. Ver, por exemplo, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) e Ausubel et al., *Current Protocols in*

Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), e Harlow e Lane *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), os quais são incorporados a este relatório por meio de referência. Reações enzimáticas e técnicas de purificação são reali-

- 5 zadas de acordo com as especificações do fabricante, como feito comunmente na técnica ou como descrito neste relatório. As nomenclaturas usadas em conexão com, e os procedimentos laboratoriais e técnicas de, química analítica, química orgânica sintética, e química medicinal e farmacêutica descritas neste relatório são aquelas de conhecimento geral e usadas co-
10 mumente na técnica. São usadas técnicas padrão para sínteses químicas, análises químicas, preparação farmacêutica, formulação, e liberação, e tratamento de pacientes.

Os termos seguintes, a menos que indicado de outro modo, devem ser entendidos como tendo os seguintes significados:

- 15 O termo "polipeptídeo" engloba proteínas naturais ou artificiais, fragmentos de proteína e análogos de polipeptídeos de uma seqüência de proteína. Um polipeptídeo pode ser monomérico ou polimérico.

- O termo "proteína isolada" ou "polipeptídeo isolado" é uma proteína ou polipeptídeo que em virtude de sua origem ou fonte de derivação (1)
20 não está associado com componentes associados naturalmente que o acompanham em seu estado natural, (2) é livre de outras proteínas da mesma espécie, (3) é expresso por uma célula de uma espécie diferente, ou (4) não ocorre na natureza. Portanto, um polipeptídeo que é sintetizado quimicamente ou sintetizado em um sistema celular diferente da célula da qual se
25 origina naturalmente será "isolado" de seus componentes associados naturalmente. Uma proteína também pode ser tornada essencialmente livre de componentes associados naturalmente por meio de isolamento, usando técnicas de purificação de proteínas de conhecimento geral na técnica.

- Uma proteína ou polipeptídeo é "substancialmente pura/o,"
30 "substancialmente homogênea/o" ou "substancialmente purificada/o" quando no mínimo cerca de 60 a 75 % de uma amostra apresenta uma única espécie de polipeptídeo. O polipeptídeo ou proteína pode ser monomérico ou

multimérico. Um polipeptídeo ou uma proteína substancialmente puros tipicamente compreenderão cerca de 50 %, 60, 70 %, 80 % ou 90 % em peso de uma amostra de proteína, mais geralmente cerca de 95 %, e preferencialmente serão mais de 99 % puros. A pureza ou homogeneidade da proteína

5 pode ser indicada por uma série de meios de conhecimento geral na técnica, tais como eletroforese de gel de poliacrilamida de uma amostra de proteína, seguida por visualização de uma única banda de polipeptídeo corando o gel com uma mancha de conhecimento geral na técnica. Para certos propósitos, pode ser proporcionada maior resolução usando HPLC ou outros meios de

10 conhecimento geral na técnica para purificação.

O termo "fragmento de polipeptídeo" como usado neste relatório refere-se a um polipeptídeo que tem uma eliminação de terminal amino e/ou amino carbóxi, mas onde a seqüência de aminoácidos remanescente é idêntica às posições correspondentes na seqüência que ocorre na natureza. Os

15 fragmentos têm tipicamente no mínimo 5, 6, 8 ou 10 aminoácidos de extensão, preferencialmente no mínimo 14 aminoácidos de extensão, mais preferencialmente no mínimo 20 aminoácidos de extensão, geralmente no mínimo 50 aminoácidos de extensão, ainda mais preferencialmente no mínimo 70, 80, 90, 100, 150 ou 200 aminoácidos de extensão.

20 O termo "análogo de polipeptídeo" como usado neste relatório refere-se a um polipeptídeo que é composto de um segmento de no mínimo 25 aminoácidos que tem substancial identidade com uma porção de uma seqüência de aminoácidos e que tem no mínimo uma das seguintes propriedades: (1) ligação específica a IGF-IR sob condições de ligação adequadas,

25 (2) capacidade para bloquear a ligação de IGF-I ou IGF-II a IGF-IR, ou (3) capacidade para reduzir a expressão na superfície celular de IGF-IR ou fosforilação de tirosina *in vitro* ou *in vivo*. Tipicamente, análogos de polipeptídeos compreendem uma substituição de aminoácido conservadora (ou inserção ou eliminação) com relação à seqüência que ocorre na natureza.

30 Análogos tipicamente têm no mínimo 20 aminoácidos de extensão, preferencialmente no mínimo 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 ou 200 aminoácidos de extensão ou mais, e podem freqüentemente ser tão longos como um poli-

peptídeo que ocorre na natureza de extensão total.

Substituições de aminoácidos preferenciais são aquelas que: (1) reduzem a suscetibilidade a proteólise, (2) reduzem a suscetibilidade à oxidação, (3) alteram a afinidade de ligação para formar complexos de proteína, 5 (4) alteram as afinidades de ligação, e (4) conferem ou modificam outras propriedades fisicoquímicas ou funcionais de tais análogos. Análogos podem incluir várias mutações de uma seqüência diferente da seqüência de peptídeos que ocorre na natureza. Por exemplo, substituições de aminoácidos únicas ou múltiplas (preferencialmente substituições de aminoácidos conservadoras) podem ser feitas na seqüência que ocorre na natureza (preferencialmente na porção do polipeptídeo fora do domínio(s) formando contatos intermoleculares. Uma substituição de aminoácido conservadora não deve alterar substancialmente as características estruturais da seqüência de origem (por exemplo, uma substituição de aminoácido não deve tender a romper uma hélice que ocorre na seqüência de origem, ou romper outros tipos de estrutura secundária que caracteriza a seqüência de origem). Exemplos de estruturas secundárias e terciárias de polipeptídeos reconhecidos na técnica são descritos em *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Crichton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden e J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y, (1991)); e Thornton et al. *Nature* 354: 105 (1991), os quais são cada um incorporado a este relatório por referência.

Análogos não-peptídicos são usados comumente na indústria farmacêutica como drogas com propriedades análogas as do peptídeo de modelo. Estes tipos de composto não-peptídico são denominados "miméticos de peptídeos" ou "peptidomiméticos". Fauchere, *J. Adv. Drug Res.* 15: 25 29 (1986); Veber e Freidinger *TINS* p. 392 (1985); e Evans et al. *J. Med. Chem.* 30: 1229 (1987), os quais são incorporados a este relatório por referência. Tais compostos são freqüentemente desenvolvidos com o auxílio de 30 modelagem molecular computadorizada. Miméticos de peptídeos que são estruturalmente semelhantes a peptídeos terapeuticamente úteis podem ser usados para produzir um efeito terapêutico ou profilático equivalente. De

modo geral, peptidomiméticos são estruturalmente semelhantes a um polipeptídeo de paradigma (isto é, um polipeptídeo que tem uma propriedade bioquímica desejada ou atividade farmacológica), tal como um anticorpo humano, mas têm uma ou mais ligações de peptídeos opcionalmente substituídas por uma ligação selecionada entre o grupo consistindo em: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis e trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$, e $-\text{CH}_2\text{SO}-$, por meio de métodos de conhecimento geral na técnica. Substituição sistemática de um ou mais aminoácidos de uma seqüência de consenso com um D-aminoácido do mesmo tipo (por exemplo, D-lisina ao invés de L-lisina) também pode ser usada para produzir peptídeos mais estáveis. Além disso, peptídeos obrigatórios compreendendo uma seqüência de consenso ou uma variação de seqüência de consenso substancialmente idêntica pode ser produzida por meio de métodos conhecidos na técnica (Rizo and Giersch *Ann. Rev. Biochem.* 61: 387 (1992), incorporados a este relatório por referência); por exemplo, adicionando resíduos de cisteína internos capazes de formar pontes dissulfeto intramoleculares as quais ciclizam o peptídeo.

Uma "imunoglobulina" é uma molécula tetramérica. Em uma imunoglobulina natural, cada tetrâmero é composto de dois pares idênticos de cadeias de polipeptídeo, cada par tendo uma cadeia "leve" (cerca de 25 kDa) e uma "pesada" (cerca de 50 - 70 kDa). A porção de terminal amino de cada cadeia inclui uma região variável de cerca de 100 a 110 ou mais aminoácidos essencialmente responsáveis por reconhecimento de antígeno. A porção de terminal carbóxi de cada cadeia define uma região constante primariamente responsável pela função efetuadora. Cadeias leves humanas são classificadas como cadeias leves κ e λ . Cadeias pesadas são classificadas como μ , Δ , γ , α , ou ϵ , e definem o isótipo de anticorpo como IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE, respectivamente. Dentro de cadeias leves e pesadas, as regiões variáveis e constantes são ligadas por uma região "J" de cerca de 12 ou mais aminoácidos, com a cadeia pesada também incluindo uma região "D" de cerca de 10 mais aminoácidos. Ver de modo geral, *Fundamental Immunology Ch. 7* (Paul, W., ed., 2^a ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (incorpora-

do por meio de referência em sua totalidade para todos os propósitos). As regiões variáveis de cada par de cadeia leve/ pesada formam o sítio de ligação de anticorpo de tal modo que uma imunoglobulina intacta tem dois sítios de ligação.

- 5 Cadeias de imunoglobulina apresentam a mesma estrutura geral de regiões de estrutura relativamente conservadas (FR) ligadas por três regiões hipervariáveis, também denominadas regiões determinantes de complementaridade ou CDRs. As CDRs das duas cadeias de cada par são alinhadas pelas regiões de estrutura, possibilitando a ligação a um epitopo específico. Do terminal N para o terminal C, tanto as cadeias leve quanto pesada compreendem os domínios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. A atribuição de aminoácidos a cada domínio está de acordo com as definições de Kabat *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), ou Chothia & Lesk
10 15 *J. Mol. Biol.* 196: 901 – 917 (1987); Chothia et al. *Nature* 342: 878 - 883 (1989).

Um "anticorpo" refere-se a uma imunoglobulina intacta ou a uma porção de ligação de antígeno da mesma que compete com o anticorpo intacto para ligação específica. Porções de ligação de antígeno podem ser produzidas por meio de técnicas de DNA recombinantes ou por clivagem enzimática ou química de anticorpos intactos. Porções de ligação de antígeno incluem, entre outras, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, dAb, e fragmentos de regiões determinantes de complementaridade (CDR), anticorpos de cadeia única (scFv), anticorpos quiméricos, diacorpos e polipeptídeos que contêm no mínimo uma porção de uma imunoglobulina que é suficiente para conferir ligação de antígeno específica ao polipeptídeo.

Conforme usado neste relatório, um anticorpo que é referido como, por exemplo, 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 4.9.2, 4.17.3 e 6.1.1, é um anticorpo que é derivado do hibridoma do mesmo nome. Por exemplo, o anticorpo 2.12.1 é derivado do hibridoma 2.12.1.

Um fragmento Fab é um fragmento monovalente consistindo nos domínios VL, VH, CL e CH I; um fragmento F(ab')₂ é um fragmento bivalente

compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte dissulfeto na região de eixo; um fragmento Fd consiste nos domínios VH e CH1; um fragmento Fv consiste nos domínios VL e VH de um único braço de um anticorpo; e um fragmento dAb (Ward et al., Nature 341: 544 - 546, 1989) consiste 5 em um domínio VH.

- Um anticorpo de cadeia única (scFv) é um anticorpo no qual regiões VL e VH são pareadas para formar moléculas monovalentes através de um ligante sintético que as torna capazes de serem transformadas como uma única cadeia de proteína (Bird et al., Science 242: 423 - 426, 1988 e 10 Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879 - 5883, 1988). Diacorpos são anticorpos bivalentes, biespecíficos nos quais os domínios VH e VL são expressos em uma única cadeia de polipeptídeo, mas usando um ligante que é curto demais para possibilitar o pareamento entre os dois domínios da mesma cadeia, deste modo forçando os domínios a parear com domínios 15 complementares a outra cadeia e criar dois sítios de ligação de antígeno (ver por exemplo, Holliger, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444 - 6448, 1993, e Poljak, R. J., et al., Structure 2: 1121 - 1123, 1994). Um ou mais CDRs podem ser incorporados em uma molécula ou de modo covalente ou de modo não-covalente para torná-la uma imunoadesina. Uma imunoadesina 20 pode incorporar os CDR(s) como parte de uma cadeia de polipeptídeo maior, pode ligar de modo covalente a CDR(s) a outra cadeia de polipeptídeo, ou pode incorporar a CDR(s) de modo não-covalente. As CDRs permitem que a imunoadesina ligue especificamente a um antígeno de interesse em particular.
- Um anticorpo pode ter um ou mais sítios de ligação. Se houver mais de um sítio de ligação, os sítios de ligação podem ser idênticos um ao outro ou podem ser diferentes. Por exemplo, uma imunoglobulina natural tem dois sítios de ligação idênticos, um anticorpo de cadeia única ou fragmento Fab tem um sítio de ligação, enquanto um anticorpo "biespecífico" ou 25 "bifuncional" tem dois sítios de ligação diferentes.

Um "anticorpo isolado" é um anticorpo que (1) não está associado com componentes associados naturalmente, inclusive outros anticorpos

associados naturalmente, que o acompanham em seu estado natural, (2) é livre de outras proteínas da mesma espécie, (3) é expresso por uma célula de uma espécie diferente, ou (4) não ocorre na natureza. Exemplos de anticorpos isolados incluem um anticorpo anti-IGF-IR que foi purificado por afinidade usando IGF-IR é um anticorpo isolado, um anticorpo anti-IGF-IR que foi sintetizado por um hibridoma ou outra linhagem celular *in vitro*, e um anticorpo anti-IGF-IR humano derivado de um camundongo transgênico .

O termo "anticorpo humano" inclui todos os anticorpos que têm uma ou mais regiões variáveis e constantes derivadas de seqüências de imunoglobulina humana. Em uma modalidade preferida, todos os domínios variáveis e constantes são derivados de seqüências de imunoglobulina humana (um anticorpo totalmente humano). Estes anticorpos podem ser preparados em uma variedade de modos, como descrito abaixo.

Um anticorpo humanizado é um anticorpo que é derivado de uma espécie não-humana, no qual alguns aminoácidos nos domínios de estrutura e constantes das cadeias pesada e leve foram mutados de modo a evitar ou anular uma resposta imune em seres humanos. Alternativamente, um anticorpo humanizado podem ser produzidos usando os domínios constantes de um anticorpo humano para os domínios variáveis de uma espécie não-humana. Exemplos de como produzir anticorpos humanizados pode ser encontrado nas Patentes dos Estados Unidos Nºs 6.054.297, 5.886.152 e 5.877.293.

O termo "anticorpo quimérico" refere-se a um anticorpo que contém uma ou mais regiões de um anticorpo e uma ou mais regiões de um ou mais anticorpos diferentes. Em uma modalidade preferida, um ou mais dos CDRs são derivados de um anticorpo anti-IGF-IR humano. Em uma modalidade mais preferida, todos os CDRs são derivados de um anticorpo anti-IGF-IR humano. Em outra modalidade preferida, os CDRs de mais de um anticorpos anti-IGF-IR humanos são misturados e combinados em um anticorpo quimérico. Por exemplo, um anticorpo quimérico pode compreender um CDR1 da cadeia leve de um primeiro anticorpo anti-IGF-IR humano pode ser combinado com CDR2 e CDR3 da cadeia leve de um segundo anticorpo

anti-IGF-IR humano, e os CDRs da cadeia pesada podem ser derivados de um terceiro anticorpo anti-IGF-IR. Além disso, as regiões de estrutura podem ser derivadas de um dos mesmos anticorpos anti-IGF-IR, de um ou mais diferentes anticorpos, tal como um anticorpo humano, ou de um anticorpo humanoizado.

Um "anticorpo neutralizante" ou "um anticorpo inibitório" é um anticorpo que inibe a ligação de IGF-IR a IGF-I quando um excesso do anticorpo anti-IGF-IR reduz a quantidade de IGF-I ligado a IGF-IR em no mínimo cerca de 20 %. Em uma modalidade preferida, o anticorpo reduz a quantidade de IGF-I ligado a IGF-IR em no mínimo 40 %, mais preferencialmente 60 %, ainda mais preferencialmente 80 %, ou de modo ainda mais preferido 85 %. A redução da ligação pode ser medida por qualquer meio conhecido de um versado na técnica comum, por exemplo, como medido em um teste de ligação competitiva *in vitro*. Um exemplo de medição da redução na ligação de IGF-I a IGF-IR é apresentado abaixo no Exemplo IV.

Um "anticorpo ativante" é um anticorpo que ativa IGF-IR em no mínimo cerca de 20 % quando adicionado a uma célula, um tecido ou organismo expressando IGF-IR. Em uma modalidade preferida, o anticorpo ativa a atividade de IGF-IR em no mínimo 40 %, mais preferencialmente 60 %, ainda mais preferencialmente 80 %, ou ainda mais preferencialmente 85 %. Em uma modalidade mais preferida, o anticorpo ativante é adicionado na presença de IGF-I ou IGF-II. Em outra modalidade preferida, a atividade do anticorpo ativante é medida determinando a quantidade de autofosforilação de tirosina de IGF-IR.

Fragmentos ou análogos de anticorpos podem ser prontamente preparados por aqueles versados na técnica comum seguindo os ensinamentos desta especificação. Terminais amino e carbóxi preferidos de fragmentos ou análogos ocorrem próximos aos limites de domínios funcionais. Domínios estruturais e funcionais podem ser identificados por meio da comparação dos dados de seqüências de nucleotídeos e/ou aminoácidos com bancos de dados de seqüências públicos ou proprietários. Preferencialmente, são usados métodos de comparação computadorizada para identificar

motivos de seqüências ou domínios de conformação de proteína prevista que ocorrem em outras proteínas de estrutura e/ou função conhecida. Métodos para identificar seqüências de proteínas que dobram em uma estrutura tridimensional conhecida são conhecidos. Bowie et al. *Science* 253: 164
5 (1991).

O termo "ressonância de plásmon superficial", conforme usado neste relatório, refere-se a um fenômeno ótico que possibilita a análise de interações bioespecíficas em tempo real por meio de detecção de alterações nas concentrações de proteína dentro de uma matriz de biosensor, por
10 exemplo usando o sistema BIACore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suécia e Piscataway, N.J.). Para descrições adicionais, ver Jonsson, U., et al. (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51: 19 - 26; Jonsson, U., et al. (1991) *Biotechniques* 11: 620 - 627; Johnsson, B., et al. (1995) *J. Mol. Recognit.* 8: 125 - 131; e Johnnson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198: 268 - 277.

15 O termo " K_{off} " refere-se à taxa baixa constante para dissociação de um anticorpo do complexo antígeno/anticorpo.

O termo " K_d " refere-se à constante de dissociação de uma interação antígeno-anticorpo particular.

20 O termo "epitopo" inclui qualquer determinante de proteína capaz de ligação específica a uma imunoglobulina ou receptor de células T. Determinantes epitópicos geralmente consistem em grupamentos de moléculas quimicamente tensoativos tais como aminoácidos de cadeias laterais de açúcares e geralmente têm características estruturais tridimensionais específicas, bem como características de carga específicas. Diz-se que um
25 anticorpo liga especificamente um antígeno quando a constante de dissociação é $\leq 1 \mu\text{M}$, preferencialmente $\leq 100 \text{ nM}$ e mais preferencialmente $\leq 10 \text{ nM}$.

Conforme usado neste relatório, os vinte aminoácidos convencionais e suas abreviações seguem o uso convencional. Ver *Immunology - A Synthesis* (2^a Edição, E.S. Golub e D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), que é incorporado a este relatório por referência. Estereoisômeros (por exemplo, D-aminoácidos) dos vinte aminoácidos con-

vencionais, aminoácidos não-naturais tais como aminoácidos α -, α -dissubstituídos, N-alquil aminoácidos, ácido láctico, e outros aminoácidos não-convencionais também podem ser componentes adequados para polipeptídeos da presente invenção. Exemplos de aminoácidos não-convencionais incluem: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetilisina, ϵ -N-acetilisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilistidina, 5-hidroxilisina, s-N- metilarginina, e outros aminoácidos e iminoácidos semelhantes (por exemplo, 4-hidroxiprolina). Na notação de polipeptídeo usada neste relatório, a direção esquerda é a direção do terminal amino e a direção direita é a direção do terminal carbóxi, de acordo com uso e convenção padrão.

O termo "polinucleotídeo" como referido neste relatório significa uma forma polimérica de nucleotídeos de no mínimo 10 bases de extensão, ou ribonucleotídeos ou desoxinucleotídeos ou uma forma modificada de qualquer tipo de nucleotídeo. O termo inclui formas de DNA de filamento único e duplo.

O termo "polinucleotídeo isolado" como usado neste relatório significará um polinucleotídeo de origem genômica, de cDNA, ou sintético ou alguma combinação dos mesmos, o qual em virtude de sua origem o "polinucleotídeo isolado" (1) não está associado com todo ou uma porção de um polinucleotídeo no qual o "polinucleotídeo isolado" é encontrado na natureza, (2) é ligado operativamente a um polinucleotídeo ao qual não está ligado na natureza, ou (3) não ocorre na natureza como parte de uma seqüência maior.

O termo "oligonucleotídeo" referido neste relatório inclui nucleotídeos que ocorrem naturalmente, e modificados ligados juntos por ligações de oligonucleotídeos que ocorrem naturalmente, e que não ocorrem naturalmente. Oligonucleotídeos são um subgrupo de polinucleotídeos geralmente compreendendo uma extensão de 200 bases ou menos. Preferencialmente oligonucleotídeos têm 10 a 60 bases de extensão e mais preferencialmente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 a 40 bases de extensão. Os oligonucleotídeos são geralmente de filamento único, por exemplo para son-

das; embora os oligonucleotídeos possam ser de filamento duplo, por exemplo para uso na construção de um mutante genético. Os oligonucleotídeos da invenção podem ser ou de sentido ou oligonucleotídeos anti-sentido.

- O termo "nucleotídeos que ocorrem naturalmente" referido neste relatório inclui desoxirribonucleotídeos e ribonucleotídeos. O termo "nucleotídeos modificados" referido neste relatório inclui nucleotídeos com grupos açúcar modificados ou substituídos e semelhantes. O termo "ligações de oligonucleotídeos" referido neste relatório inclui ligações de oligonucleotídeos como fosforotioato, fosforoditioato, fosforosselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforaniladato, fosforoamidato, e semelhantes. Ver por exemplo, LaPlanche et al. *Nucl. Acids Res.* 14: 9081 (1986); Stec et al. *J. Am. Chem. Soc.* 106: 6077 (1984); Stein et al. *Nucl. Acids Res.* 16: 3209 (1988); Zon et al. *Anti-Cancer Drug Design* 6: 539 (1991); Zon et al. *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, pp. 87 - 108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al. Patente dos Estados Unidos Nº, 5.151.510; Uhlmann e Peyman *Chemical Reviews* 90: 543 (1990), cujas descrições são incorporadas a este relatório por referência. Um oligonucleotídeo pode incluir uma marca para detecção, se desejado.
- Seqüências "operativamente ligadas" incluem tanto seqüências de controle de expressão que são contíguas ao gene de interesse e seqüências de controle de expressão que agem em *trans* ou em uma distância para controlar o gene de interesse. O termo "seqüência de controle de expressão" como usado neste relatório refere-se à seqüências de polinucleotídeos as quais são necessárias para efetuar a expressão e processamento de seqüências codificantes às quais estas estão ligadas. Seqüências de controle de expressão incluem seqüências adequadas de iniciação, de transcrição, de terminação, estimuladoras e intensificadores; sinais de processamento de RNA eficazes tais como sinais de ligação e de poliadenilação; seqüências que estabilizam o mRNA citoplasmático; seqüências que intensificam a eficiácia da translação (isto é, seqüência de consenso de Kozak); seqüências que intensificam a estabilidade de proteína; e quando desejado, seqüências

que intensificam a secreção de proteínas. A natureza de tais seqüências de controle difere dependendo do organismo hospedeiro; em procariotas, tais seqüências de controle geralmente incluem seqüência estimuladora, sítio de ligação ribossômico, e de terminação de transcrição; em eucariotas, geralmente, tais seqüências de controle incluem seqüências estimuladoras e seqüência de terminação de transcrição. O termo "seqüências de controle" pretende incluir, no mínimo, todos os componentes cuja presença seja essencial para expressão e processamento, e também pode incluir componentes adicionais cuja presença seja vantajosa, por exemplo, seqüências líder e seqüências parceiras de fusão.

O termo "vetor", conforme usado neste relatório, pretende referir-se a uma molécula de ácido nucléico capaz de transportar outro ácido nucléico ao qual foi ligada. Um tipo de vetor é um "plasmídeo", o qual refere-se a uma alça de DNA de filamento duplo circular na qual segmentos de DNA adicionais pode ser ligados. Outro tipo de vetor é um vetor viral, em que segmentos de DNA adicionais podem ser ligados no genoma viral. Alguns vetores são capazes de replicação autônoma em uma célula hospedeira na qual estes são introduzidos (por exemplo, vetores bacterianos tendo uma origem bacteriana de replicação e vetores de mamíferos epissônicos). Outros vetores (por exemplo, vetores de mamíferos não-epissônicos) podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira na introdução na célula hospedeira, e deste modo são replicados junto com o genoma hospedeiro. Além disso, alguns vetores são capazes de orientar a expressão de genes aos quais estes estão operativamente ligados. Tais vetores são referidos neste relatório como "vetores de expressão recombinantes" (ou simplesmente, "vetores de expressão"). De modo geral, vetores de expressão de utilidade em técnicas de DNA recombinante estão freqüentemente sob a forma de plasmídeos. No presente relatório descritivo, "plasmídeo" e "vetor" podem ser usados de modo intercambiável uma vez que o plasmídeo é a forma de vetor usada mais comumente. No entanto, a invenção pretende incluir tais outras formas de vetores de expressão, tais como vetores virais (por exemplo, retrovírus de replicação defeituosa, adenovírus e vírus adeno-

associado), os quais servem funções equivalentes.

O termo "célula hospedeira recombinante" (ou simplesmente "célula hospedeira"), conforme usado neste relatório, pretende referir-se a uma célula na qual um vetor de expressão recombinante foi introduzido.

- 5 Deve ser entendido que tais termos pretendem referir-se não somente à células em questão em particular mas à descendência de uma tal célula. Como certas modificações podem ocorrer em gerações sucessivas devido ou a mutação ou a influências ambientais, tal descendência não pode, de fato, ser idêntica à células de origem, mas estão ainda incluídas dentro do âmbito do
10 termo "célula hospedeira" como usado neste relatório.

O termo " hibridizam seletivamente" referido neste relatório significa ligam de modo detectável e específico. Polinucleotídeos, oligonucleotídeos e fragmentos dos mesmos de acordo com a invenção hibridizam seletivamente a filamentos de ácido nucléico sob condições de hibridização e

- 15 lavagem que minimizam quantidades apreciáveis de ligação detectável a ácidos nucléicos não-específicos. Podem ser usadas condições de "alto rigor" ou "altamente rigorosas" para obter condições de hibridização seletiva como conhecido na técnica e discutido neste relatório. Um exemplo de condições de "alto rigor" ou "altamente rigorosas" é um método para incubar um
20 polinucleotídeo com outro polinucleotídeo, em que um polinucleotídeo pode ser afixado a uma superfície sólida tal como uma membrana, em um tampão de hibridização de 6X SSPE ou SSC, 50 % de formamida, 5X reagente de Denhardt, 0,5 % de SDS, 100 µg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado, fragmentado em uma temperatura de hibridização de 42 °C por 12 -
25 16 horas, seguido por duas vezes lavagem a 55 °C usando um tampão de lavagem de 1X SSC, 0,5 % de SDS. Ver também Sambrook et al., *supra*, pp. 9.50 - 9.55.

- O termo "percentagem de identidade de seqüência" no contexto de seqüências de ácidos nucléicos refere-se aos resíduos em duas seqüências as quais são as mesmas quando alinhadas para máxima correspondência. A extensão da comparação da identidade de seqüência pode ser sobre um trecho de no mínimo cerca de nove nucleotídeos, geralmente no mínimo
30

cerca de 18 nucleotídeos, mais geralmente no mínimo cerca de 24 nucleotídeos, tipicamente no mínimo cerca de 28 nucleotídeos, mais tipicamente no mínimo cerca de 32 nucleotídeos, e preferencialmente no mínimo cerca de 36, 48 ou mais nucleotídeos. Existe uma série de algoritmos diferentes conhecidos na técnica os quais podem ser usados para medir a identidade de seqüências de nucleotídeos. Por exemplo, seqüências de polinucleotídeos podem ser comparadas usando FASTA, Gap ou Bestfit, os quais são programas na Versão 10.0 do Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA, que inclui, por exemplo, os programas FASTA2 e FASTA3, fornece alinhamentos e percentagem de identidade de seqüência das regiões da melhor sobreposição entre as seqüências de pesquisa e busca (Pearson, *Methods Enzymol.* 183: 63 - 98 (1990); Pearson, *Methods Mol Biol.* 132: 185 - 219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol.* 266: 227 - 258 (1996); Pearson, *J. Mol. Biol.* 276: 71 - 84 (1998); incorporados a este relatório por meio de referência). A menos que especificado de outro modo, são usados parâmetros padrão para um programa ou algoritmo em particular. Por exemplo, a percentagem de identidade de seqüência entre seqüências de ácidos nucléicos pode ser determinada usando FASTA com seus parâmetros padrão (um tamanho de palavra de 6 e o fator NOPAM para a matriz de contagem) ou usando Gap com seus parâmetros padrão como fornecido no GCG Versão 6.1, incorporado a este relatório por meio de referência.

Uma referência a uma seqüência de ácidos nucléicos engloba seu complemento a menos que especificado de outro modo. Portanto, uma referência a uma molécula de ácido nucléico tendo uma seqüência particular deve ser entendida como englobando seu filamento complementar, com sua seqüência complementar.

Na técnica da biologia molecular, os pesquisadores usam os termos "identidade de percentagem de seqüência", "similaridade de percentagem de seqüência" e "homologia de percentagem de seqüência" de modo intercambiável. Neste pedido, estes termos devem ter o mesmo significado com respeito a seqüências de ácidos nucléicos somente.

O termo "substancial similaridade" ou "substancial similaridade de seqüência", ao referir a um ácido nucléico ou fragmento do mesmo, indica que, quando alinhado de modo ótimo com inserções ou eliminações de nucleotídeos adequados com outro ácido nucléico (ou seu filamento complementar), há identidade de seqüências de nucleotídeos em no mínimo cerca de 85 %, preferencialmente no mínimo cerca de 90 %, e mais preferencialmente no mínimo cerca de 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % das bases de nucleotídeo, como medido por qualquer algoritmo de identidade de seqüência de conhecimento geral, tal como FASTA, BLAST ou Gap, como discutido acima.

Como aplicado para polipeptídeos, o termo "substancial identidade" significa que duas seqüências de peptídeos, quando alinhadas de modo ótimo, tal como pelos programas GAP ou BESTFIT usando pesos de deficiência padrão, partilham no mínimo 75 % ou 80 % de identidade de seqüência, preferencialmente no mínimo 90 % ou 95 % de identidade de seqüência, ainda mais preferencialmente no mínimo 98 % ou 99 % de identidade de seqüência. Preferencialmente, posições de resíduos as quais não são idênticas diferem por substituições de aminoácidos conservadoras. Uma "substituição de aminoácido conservadora" é uma na qual um resíduo aminoácido é substituído por outro resíduo aminoácido tendo uma cadeia lateral (grupo R) com propriedades químicas semelhantes (por exemplo, carga ou hidrofobicidade). De modo geral, uma substituição de aminoácido conservadora não alterará substancialmente as propriedades funcionais da proteína. Em casos onde duas ou mais seqüências de aminoácidos diferem uma da outra por substituições conservadoras, a percentagem de identidade de seqüência ou grau de similaridade pode ser ajustada para cima para corrigir para a natureza conservadora da substituição. Os meios para preparar este ajuste são de conhecimento geral daqueles versados na técnica. Ver, por exemplo, Pearson, Methods Mol. Biol. 24; 307 - 31 (1994), incorporado a este relatório por meio de referência. Exemplos de grupos de aminoácidos que têm cadeias laterais com propriedades químicas semelhantes incluem 1) cadeias laterais alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) ca-

deias laterais de hidroxila alifáticas: serina e treonina; 3) cadeias laterais contendo amido: asparagina e glutamina; 4) cadeias laterais aromáticas: fenilalanina, tirosina e triptofano; 5) cadeias laterais básicas: lisina, arginina e histidina; e 6) cadeias laterais contendo enxofre são cisteína e metionina.

- 5 Grupos de substituição de aminoácidos conservadores preferenciais são: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato e asparagina-glutamina.

Alternativamente, uma substituição conservadora é qualquer alteração tendo um valor positivo na matriz de probabilidade de registro

- 10 PAM250 revelada em Gonnet et al., Science 256: 1443 - 45 (1992), incorporada a este relatório por meio de referência. Uma substituição "moderadamente conservadora" é qualquer alteração tendo um valor não-negativo na matriz de probabilidade de registro PAM250.

- A similaridade de seqüência para polipeptídeos, a qual também
15 é referida como identidade de seqüência, é tipicamente medida usando programa de análise de seqüência. O programa de análise de proteínas combina seqüências semelhantes usando medidas de similaridade atribuídas a várias substituições, eliminações e outras modificações, inclusive substituições de aminoácidos conservadoras. Por exemplo, GCG contém programas
20 tais como "Gap" e "Bestfit" os quais podem ser usados com parâmetros padrão para determinar a homologia de seqüência ou a identidade de seqüência entre polipeptídeos intimamente relacionados, tais como polipeptídeos homólogos de diferentes espécies de organismos ou entre uma proteína selvagem e uma mutante da mesma. Ver, por exemplo, GCG Versão 6.1. Seqüências de polipeptídeos também podem ser comparadas usando FASTA usando parâmetros padrão ou recomendados, um programa em GCG Versão 6.1. FASTA (por exemplo, FASTA2 e FASTA3) fornece alinhamentos e percentagem de identidade de seqüência das regiões da melhor sobreposição entre as seqüências de pesquisa e busca (Pearson (1990); Pearson
25 (2000). Outro algoritmo preferencial ao comparar uma seqüência da invenção com um banco de dados contendo um grande número de seqüências de diferentes organismos é o programa de computador BLAST, especialmente
30

blastp ou tblastn, usando parâmetros padrão. Ver, por exemplo, Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403 - 410 (1990); Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389 - 402 (1997); incorporado a este relatório por meio de referência.

- A extensão das seqüências de polipeptídeos comparadas para
- 5 homologia geralmente terão no mínimo cerca de 16 resíduos aminoácidos, geralmente no mínimo cerca de 20 resíduos, mais geralmente no mínimo cerca de 24 resíduos, tipicamente no mínimo cerca de 28 resíduos, e preferencialmente mais de cerca de 35 resíduos. Ao pesquisar um banco de dados contendo seqüências de um grande número de diferentes organismos, é
- 10 preferencial comparar seqüências de aminoácidos.

Conforme usado neste relatório, os termos "marca" ou "marcado" refere-se à incorporação de outra molécula no anticorpo. Em uma modalidade, a marca é um marcador detectável, por exemplo, incorporação de um aminoácido radiomarcado ou fixação a um polipeptídeo de porções biotiniladas que podem ser detectadas por avidina marcada (por exemplo, estreptavidina contendo um marcador fluorescente ou atividade enzimática que pode ser detectada por métodos óticos ou colorimétricos). Em outra modalidade, a marca ou marcador pode ser terapêutico, por exemplo, um conjugado de drogas ou toxina. Vários métodos de marcação de polipeptídeos e glicoproteínas são conhecidos na técnica e podem ser usados. Exemplos de marcas para polipeptídeos incluem, porém sem limitação, os seguintes: radioisótopos ou radionuclídeos (por exemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), marcas fluorescentes (por exemplo, FITC, rodamina, fósforos lantanídeos), marcas enzimáticas (por exemplo, peroxidase de rábano silvestre, β -galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina), marcadores quimiluminescentes, grupos biotinilados, epítopes de polipeptídeos predeterminados reconhecidos por um repórter secundário (por exemplo, seqüências de pares de zíper de leucina, sítios de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação metálicos, etiquetas de epítopes), agentes magnéticos, tais como quelatos de gadolínio, toxinas tais como toxina pertussis, taxol, citochalasina B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposídeo, tenoposídeo, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, di-

dróxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deidrotestosterona, glicocorticóides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, e puromicina e análogos ou homólogos dos mesmos. Em algumas modalidades, marcas são fixadas por braços espaçadores de várias extensões para reduzir o potencial de impedimento estérico.

O termo "agente" é usado neste relatório para denotar um composto químico, uma mistura de compostos químicos, uma macromolécula biológica, ou um extrato feito de materiais biológicos. O termo "agente farmacêutico ou droga" como usado neste relatório refere-se a um composto químico ou composição capaz de induzir um efeito terapêutico desejado quando administrado adequadamente a um paciente. Outros termos químicos neste relatório são usados de acordo com o uso convencional na técnica, como exemplificado pelo *The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)), incorporado a este relatório por meio de referência).

O termo "agente antineoplástico" é usado neste relatório para se referir a agentes que têm a propriedade funcional de inibir o desenvolvimento ou a progressão de um neoplasma em um ser humano, particularmente uma lesão maligna (cancerosa), tal como um carcinoma, sarcoma, linfoma ou leucemia. A inibição de metástase é freqüentemente uma propriedade de agentes antineoplásticos.

O termo paciente inclui pacientes humanos e veterinários.

Anticorpos Anti-IGF-IR Humanos e Caracterização dos mesmos

Os anticorpos humanos evitam alguns dos problemas associados com anticorpos que possuem regiões variáveis e/ou constantes de camundongo ou rato. A presença de tais seqüências derivadas de camundongo ou rato pode levar a uma rápida liberação dos anticorpos ou pode levar à produção de uma resposta imune contra o anticorpo por um paciente. Portanto, em uma modalidade, a invenção fornece anticorpos anti-IGF-IR humanizados. Em uma modalidade preferencial, a invenção fornece anticorpos anti-IGF-IR totalmente humanos introduzindo genes de imunoglobulina humana em um roedor de modo que o roedor produza anticorpos totalmente

humanos. São mais preferenciais anticorpos IGF-IR anti-humanos totalmente humanos. Espera-se que anticorpos anti-IGF-IR totalmente humanos minimizem as reações imunogênicas e alérgicas intrínsecas para anticorpos monoclonais de camundongo ou derivados de camundongos (Mabs) e deste modo aumentem a eficácia e a segurança dos anticorpos administrados. Espera-se que o uso de anticorpos totalmente humanos possa proporcionar uma vantagem substancial no tratamento de doenças crônicas e recorrentes humanas, tais como inflamação e câncer, que podem necessitar de administrações repetidas de anticorpos. Em outra modalidade, a invenção fornece um anticorpo anti-IGF-IR que não liga o complemento.

Em uma modalidade preferencial, o anticorpo anti-IGF-IR é 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1. Em outra modalidade preferencial, o anticorpo anti-IGF-IR compreende uma cadeia leve comprendendo uma seqüência de aminoácidos selecionada entre SEQ ID NO: 2, 15 6, 10, 14, 18 ou 22, ou um ou mais CDRs destas seqüências de aminoácidos. Em outra modalidade preferencial, o anticorpo anti-IGF-IR compreende uma cadeia pesada comprendendo uma seqüência de aminoácidos selecionada entre SEQ ID NO: 4, 8, 12, 16, 20 ou 24 ou um ou mais CDRs destas seqüências de aminoácidos.

20 Classe e Subclasse de Anticorpos Anti-IGF-IR

O anticorpo pode ser uma molécula IgG, uma IgM, uma IgE, uma IgA ou uma IgD. Em uma modalidade preferencial, o anticorpo é um IgG e é um subtipo IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Em uma modalidade mais preferencial, o anticorpo anti-IGF-IR é a subclasse IgG2. Em outra modalidade preferencial, o anticorpo anti-IGF-IR é a mesma classe e subclasse do anticorpo 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1, que é IgG2.

A classe e subclasse de anticorpos anti-IGF-IR pode ser determinada por meio de qualquer método conhecido na técnica. De modo geral, a classe e subclasse de um anticorpo pode ser determinada usando anticorpos que são específicos para uma classe e subclasse particulares de anticorpos. Tais anticorpos estão disponíveis comercialmente. A classe e subclasse podem ser determinadas por ELISA, Western blot bem como outras

técnicas. Alternativamente, a classe e subclasse podem ser determinadas por meio de seqüenciamento de todos ou uma porção dos domínios constantes das cadeias pesadas e/ou leves dos anticorpos, comparando suas seqüências de aminoácidos com seqüências de aminoácidos conhecidas de 5 várias classes e subclasses de imunoglobulinas, e determinando a classe e subclasse dos anticorpos.

Espécies e Seletividade Molecular

Em outro aspecto da invenção, o anticorpo anti-IGF-IR demonstra tanto seletividade por espécie quanto por molécula. Em uma modalidade, 10 o anticorpo anti-IGF-IR liga a IGF-IR humana, de *cinomologous* ou de *rhesus*. Em uma modalidade preferencial, o anticorpo anti-IGF-IR não liga a IGF-IR de camundongo, de rato, de cobaia, de cachorro ou de coelho. Em outra modalidade preferencial, o anticorpo anti-IGF-IR não liga a uma espécie de macaco do Novo Mundo tal como um sagüí. Seguindo os ensinamentos da especificação, pode-se determinar a seletividade da espécie para 15 o anticorpo anti-IGF-IR usando métodos de conhecimento geral na técnica. Por exemplo, pode-se determinar seletividade por espécie usando Western blot, FACS, ELISA ou RIA. Em uma modalidade preferencial, pode-se determinar a seletividade por espécie usando Western blot.

20 Em outra modalidade, o anticorpo anti-IGF-IR tem uma seletividade para IGF-IR que é no mínimo 50 vezes maior do que sua seletividade para receptor de insulina. Em uma modalidade preferencial, a seletividade do anticorpo anti-IGF-IR é mais de 100 vezes maior do que sua seletividade para receptor de insulina. Em uma modalidade ainda mais preferencial, o 25 anticorpo anti-IGF-IR não apresenta qualquer ligação específica apreciável a qualquer outra proteína diferente de IGF-IR. Pode-se determinar a seletividade do anticorpo anti-IGF-IR para IGR-IR usando métodos de conhecimento geral na técnica seguindo os ensinamentos da especificação. Por exemplo, pode-se determinar a seletividade usando Western blot, FACS, 30 ELISA ou RIA. Em uma modalidade preferencial, pode-se determinar a seletividade molecular usando Western blot.

Afinidade de Ligação de Anti-IGF-IR para IGF-IR

Em outro aspecto da invenção, os anticorpos anti-IGF-IR ligam a IGF-IR com alta afinidade. Em uma modalidade, o anticorpo anti-IGF-IR liga a IGF-IR com um K_d de 1×10^{-8} M ou menos. Em uma modalidade mais preferencial, o anticorpo liga a IGF-IR com um K_d de 1×10^{-9} M ou menos.

5 Em uma modalidade ainda mais preferencial, o anticorpo liga a IGF-IR com um K_d ou 5×10^{-10} M ou menos. Em outra modalidade preferencial, o anticorpo liga a IGF-IR com um K_d ou 1×10^{-10} M ou menos. Em outra modalidade preferencial, o anticorpo liga a IGF-IR com substancialmente o mesmo K_d

10 que um anticorpo selecionado entre 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1. Em outra modalidade preferencial, o anticorpo liga a IGF-IR com substancialmente o mesmo K_d que um anticorpo que compreende um ou mais CDRs de um anticorpo selecionado entre 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1. Em ainda outra modalidade preferencial, o anticorpo liga a IGF-IR com substancialmente o mesmo K_d que um anticorpo que compreende uma das seqüências de aminoácidos selecionadas entre SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 ou 24. Em outra modalidade preferencial, o anticorpo liga a IGF-IR com substancialmente o mesmo K_d que um anticorpo que compreende um ou mais CDRs de um anticorpo que

15 compreende uma das seqüências de aminoácidos selecionadas entre SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 ou 24.

20 Em ainda outra modalidade preferencial, o anticorpo que compreende uma das seqüências de aminoácidos selecionadas entre SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 ou 24.

Em outro aspecto da invenção, o anticorpo anti-IGF-IR tem um baixo índice de dissociação. Em uma modalidade, o anticorpo anti-IGF-IR tem um K_{off} de $1 \times 10^{-1} s^{-1}$ ou menor. Em uma modalidade preferencial, o K_{off} é $5 \times 10^{-5} s^{-1}$ ou menor. Em outra modalidade preferencial, o K_{off} é essencialmente o mesmo que um anticorpo selecionado entre 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1. Em outra modalidade preferencial, o anticorpo liga a IGF-IR com essencialmente o mesmo K_{off} que um anticorpo que compreende um ou mais CDRs de um anticorpo selecionado entre 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1. Em ainda outra modalidade preferencial, o anticorpo liga a IGF-IR com essencialmente o mesmo K_{off} que um anticorpo que compreende uma das seqüências de aminoácidos selecio-

nadas entre as SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 ou 24. Em outra modalidade preferencial, o anticorpo liga a IGF-IR com essencialmente o mesmo K_{off} que um anticorpo que compreende um ou mais CDRs de um anticorpo que compreende uma das seqüências de aminoácidos selecionadas entre SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22.

A afinidade de ligação e o índice de dissociação de um anticorpo anti-IGF-IR para IGF-IR pode ser determinado por meio de qualquer método conhecido na técnica. Em uma modalidade, a afinidade de ligação pode ser medida por meio de ELISAs competitivos, RIAs ou ressonância de plásmon superficial, tal como BIACore. O índice de dissociação também pode ser medido por meio de ressonância de plásmon superficial. Em uma modalidade mais preferencial, a afinidade de ligação e o índice de dissociação são medidos por meio de ressonância de plásmon superficial. Em uma modalidade ainda mais preferencial, a afinidade de ligação e o índice de dissociação são medidos usando um BIACore. Um exemplo de determinação da afinidade de ligação e do índice de dissociação é descrito abaixo no Exemplo II.

Meia-Vida de Anticorpos Anti-IGF-IR

De acordo com outro objeto da invenção, o anticorpo anti-IGF-IR tem uma meia-vida de no mínimo um dia *in vitro* ou *in vivo*. Em uma modalidade preferencial, o anticorpo ou porção do mesmo tem uma meia-vida de no mínimo três dias. Em uma modalidade mais preferencial, o anticorpo ou porção do mesmo tem uma meia-vida de quatro dias ou mais longa. Em outra modalidade, o anticorpo ou porção do mesmo tem uma meia-vida de oito dias ou mais. Em outra modalidade, o anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo é derivado ou modificado de modo que tenha uma meia-vida mais longa, como discutido abaixo. Em outra modalidade preferencial, o anticorpo pode conter mutações de ponto para aumentar a meia-vida sérica, tal como descrito em WO 00/09560, publicada em 24 de fevereiro de 2000.

A meia-vida do anticorpo pode ser medida por qualquer meio conhecido de quem tenha conhecimento regular da técnica. Por exemplo, a meia-vida do anticorpo pode ser medida por Western blot, ELISA ou RIA durante um período de tempo adequado. A meia-vida do anticorpo pode ser

medida em quaisquer animais adequados, por exemplo, um macaco, tal como um macaco *cinomologous*, um primata ou um ser humano.

Identificação de Epítopes de IGF-IR Reconhecidos por Anticorpo Anti-IGF-IR

A invenção também fornece um anticorpo anti-IGF-IR que liga o mesmo antígeno ou epitopo como um anticorpo anti-IGF-IR humano. Além disso, a invenção fornece um anticorpo anti-IGF-IR que tem competição cruzada com um anticorpo anti-IGF-IR humano. Em uma modalidade preferencial, o anticorpo anti-IGF-IR humano é 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1. Em outra modalidade preferencial, o anti-IGF-IR humano 10 compreende um ou mais CDRs de um anticorpo selecionado entre 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1. Em ainda outra modalidade preferencial, o anti-IGF-IR humano compreende uma das seqüências de aminoácidos selecionadas entre SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 ou 24. Em outra modalidade preferencial, o anti-IGF-IR humano compreende 15 um ou mais CDRs de um anticorpo que compreende uma das seqüências de aminoácidos selecionadas entre SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 ou 24. Em uma modalidade altamente preferencial, o anticorpo anti-IGF-IR é outro anticorpo humano.

Pode-se determinar se um anticorpo anti-IGF-IR liga ao mesmo 20 antígeno usando uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, pode-se determinar se um anticorpo anti-IGF-IR de teste liga ao mesmo antígeno usando um anticorpo anti-IGF-IR para capturar um antígeno que se sabe que liga ao anticorpo anti-IGF-IR, tal como IGF-IR, elutriando o antígeno do anticorpo, e em seguida determinando se o anticorpo de teste 25 ligará ao antígeno elutriado. Pode-se determinar se um anticorpo liga ao mesmo epitopo como um anticorpo anti-IGF-IR ligando o anticorpo anti-IGF-IR a IGF-IR sob condições de saturação, e em seguida medindo a capacidade do anticorpo de teste para ligar a IGF-IR. Se o anticorpo de teste for capaz de ligar ao IGF-IR ao mesmo tempo que o anticorpo anti-IGF-IR, então o 30 anticorpo de teste liga a um epitopo diferente do anticorpo anti-IGF-IR. No entanto, se o anticorpo de teste não for capaz de ligar ao IGF-IR ao mesmo tempo, então o anticorpo de teste liga ao mesmo epitopo que o anticorpo

anti-IGF-IR humano. Este experimento pode ser realizado usando ELISA, RIA ou ressonância de plásmon superficial. Em uma modalidade preferencial, o experimento é realizado usando ressonância de plásmon superficial. Em uma modalidade mais preferencial, é usado BIACore. Pode-se também determinar se um anticorpo anti-IGF-IR que tem competição cruzada com um anticorpo anti-IGF-IR. Em uma modalidade preferencial, pode-se determinar se um anticorpo anti-IGF-IR que tem competição cruzada com outro usando o mesmo método que é usado para medir se o anticorpo anti-IGF-IR é capaz de ligar ao mesmo epitopo que outro anticorpo anti-IGF-IR.

10 Utilização de Cadeias Leves e Pesadas

A invenção também fornece um anticorpo anti-IGF-IR que comprehende seqüências variáveis codificadas por um gene κ humano. Em uma modalidade preferencial, as seqüências variáveis são codificadas ou pela família genética $V\kappa$ A27, A30 ou O12. Em uma modalidade preferencial, as seqüências variáveis são codificadas por uma família genética $V\kappa$ A30 humana. Em uma modalidade mais preferencial, a cadeia leve comprehende não mais de dez substituições de aminoácidos da linhagem-germinativa $V\kappa$ A27, A30 ou O12, preferencialmente não mais de seis substituições de aminoácidos, e mais preferencialmente não mais de três substituições de aminoácidos. Em uma modalidade preferencial, as substituições de aminoácidos são substituições conservadoras.

As SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18 e 22 proporcionam as seqüências de aminoácidos das regiões variáveis de seis cadeias leves κ anti-IGF-IR. As SEQ ID NOS: 38, 40 e 42 proporcionam as seqüências de aminoácidos das três cadeias leves κ da linhagem-germinativa das quais as seis cadeias leves κ anti-IGF-IR são derivadas. As Figuras 1A - 1C mostram os alinhamentos das seqüências de nucleotídeos das regiões variáveis das cadeias leves dos seis anticorpos anti-IGF-IR umas às outras e para as seqüências da linhagem-germinativa das quais elas são derivadas. Segundo os ensinamentos desta especificação, uma pessoa com conhecimento regular da técnica pode determinar a seqüência de aminoácidos codificada das seis cadeias leves κ anti-IGF-IR e as cadeias leves κ da linhagem-

germinativa e determinar as diferenças entre as seqüências da linhagem-germinativa e as seqüências de anticorpos.

Em uma modalidade preferencial, o VL do anticorpo anti-IGF-IR contém as mesmas substituições de aminoácidos, relativas à seqüência de 5 aminoácidos da linhagem-germinativa, que qualquer um ou mais do VL de anticorpos 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1. Por exemplo, o VL do anticorpo anti-IGF-IR pode conter uma ou mais substituições de aminoácidos que são as mesmas que as presentes no anticorpo 2.13.2, outra substituição de aminoácidos que é a mesma que a presente no anticorpo 10 2.14.3, e outra substituição de aminoácidos que é a mesma que o anticorpo 4.9.2. Deste modo, pode-se misturar e combinar diferentes características de ligação de anticorpo de modo a alterar, por exemplo, a afinidade do anticorpo para IGF-IR ou seu índice de dissociação do antígeno. Em outra modalidade, as substituições de aminoácidos são feitas na mesma posição que as 15 encontradas em qualquer um ou mais do VL de anticorpos 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1, mas substituições conservadoras de aminoácidos são feitas ao invés de usar o mesmo aminoácido. Por exemplo, se a substituição de aminoácidos comparada com a linhagem-germinativa em um dos anticorpos 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1 é 20 glutamato, pode-se substituir conservadoramente aspartato. Do mesmo modo, se a substituição de aminoácidos for serina, pode-se substituir conservadoramente treonina.

Em outra modalidade preferencial, a cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácidos que é a mesma que a seqüência de aminoácidos do VL de 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1. Em outra modalidade altamente preferencial, a cadeia leve compreende seqüências de aminoácidos que são as mesmas que as regiões CDR da cadeia leve de 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1. Em outra modalidade preferencial, a cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácidos de no mínimo uma região CDR da cadeia leve de 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1. Em outra modalidade preferencial, a cadeia leve compreende seqüências de aminoácidos de CDRs de diferentes cadeias

leves. Em uma modalidade mais preferencial, os CDRs de diferentes cadeias leves são obtidos de 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1. Em outra modalidade preferencial, a cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada entre as SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 5 18 ou 22. Em outra modalidade, a cadeia leve compreende uma seqüência de aminoácidos codificados por uma seqüência de ácidos nucléicos selecionados entre as SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 13, 17 ou 21, ou uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica uma seqüência de aminoácidos tendo 1 - 10 inserções, eliminações ou substituições de aminoácidos da mesma. Preferencialmente, as substituições de aminoácidos são substituições de aminoácidos conservadoras. Em outra modalidade, o anticorpo ou porção do mesmo compreende uma cadeia leve lâmbda.

A presente invenção também fornece um anticorpo anti-IGF-IR ou porção do mesmo compreende uma cadeia pesada humana ou uma seqüência derivada de uma cadeia pesada humana. Em uma modalidade, a seqüência de aminoácidos de cadeia pesada é derivada de uma família genética humana V_H DP-35, DP-47, DP-70, DP-71 ou VIV-4/4.35. Em uma modalidade preferencial, a seqüência de aminoácidos de cadeia pesada é derivada de uma família genética humana V_H DP-47. Em uma modalidade mais preferencial, a cadeia pesada compreende não mais de oito alterações de aminoácidos da germinativa V_H DP-35, DP-47, DP-70, DP-71 ou VIV-4/4.35, 15 mais preferencialmente não mais de seis alterações de aminoácidos, e ainda mais preferencialmente não mais de três alterações de aminoácidos.

As SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20 e 24 proporcionam as seqüências de aminoácidos das regiões variáveis de seis cadeias pesadas anti-IGF-IR. As SEQ ID NOS: 30, 32, 34, 36 e 44 proporcionam as seqüências de aminoácidos e as SEQ ID NOS: 29, 31, 33, 35 e 43 proporcionam as seqüências de nucleotídeos das cadeias pesadas da linhagem-germinativa DP-35, DP-47, DP-70, DP-71 e VIV-4, respectivamente. As Figuras 2A - 2D mostram os alinhamentos das seqüências de aminoácidos da região variável dos seis anticorpos anti-IGF-IR para suas seqüências de linhagem-germinativa correspondentes. Seguindo os ensinamentos desta especifica-

ção, uma pessoa versada na técnica pode determinar a seqüência de aminoácidos codificados das seis cadeias pesadas anti-IGF-IR e as cadeias pesadas da linhagem-germinativa e determinar as diferenças entre as seqüências da linhagem-germinativa e as seqüências de anticorpos.

- 5 Em uma modalidade preferencial, o VH do anticorpo anti-IGF-IR contém as mesmas substituições de aminoácidos, com relação à seqüência de aminoácidos da linhagem-germinativa, como qualquer um ou mais do VH de anticorpos 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1. De modo semelhante ao que foi discutido acima, o VH do anticorpo anti-IGF-IR pode
- 10 conter uma ou mais substituições de aminoácidos que são as mesmas que as presentes no anticorpo 2.13.2, outra substituição de aminoácidos que é a mesma que a presente no anticorpo 2.14.3, e outra substituição de aminoácidos que é a mesma que o anticorpo 4.9.2. Deste modo, pode-se misturar e combinar diferentes características da ligação de anticorpo de modo a alterar, por exemplo, a afinidade do anticorpo para IGF-IR ou seu índice de dissociação do antígeno. Em outra modalidade, as substituições de aminoácidos são feitas na mesma posição que as encontradas em qualquer um ou mais do VH dos anticorpos 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.17.3., 4.9.2 ou 6.1.1, mas substituições de aminoácidos conservadoras são feitas ao invés
- 15 de usar o mesmo aminoácido.
- 20

Em outra modalidade preferencial, a cadeia pesada compreende uma seqüência de aminoácidos que é a mesma que a seqüência de aminoácidos do VH de 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1. Em outra modalidade altamente preferencial, a cadeia pesada compreende seqüências de aminoácidos que são as mesmas que as regiões CDR da cadeia pesada de 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1. Em outra modalidade preferencial, a cadeia pesada compreende uma seqüência de aminoácidos de no mínimo uma região CDR da cadeia pesada de 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1. Em outra modalidade preferencial, a cadeia pesada compreende seqüências de aminoácidos de CDRs de diferentes cadeias pesadas. Em uma modalidade mais preferencial, os CDRs de diferentes cadeias pesadas são obtidos de 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3,

- 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1. Em outra modalidade preferencial, a cadeia pesada compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada entre as SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20 ou 24. Em outra modalidade, a cadeia pesada compreende uma seqüência de aminoácidos codificada por uma seqüência de ácidos nucléicos selecionada entre as SEQ ID NOS: 3, 7, 11, 15, 19 ou 23, ou uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica uma seqüência de aminoácidos tendo 1 - 10 inserções, eliminações ou substituições de aminoácidos da mesma. Em outra modalidade, as substituições são substituições de aminoácidos conservadoras.
- 10 Inibição da Atividade de IGF-IR por Anticorpo Anti-IGF-IR
Inibição da Ligação de IGF-I a IGF-IR
- Em outra modalidade, a invenção fornece um anticorpo anti-IGF-IR que inibe a ligação de IGF-I a IGF-IR ou a ligação de IGF-II a IGF-IR. Em uma modalidade preferencial, o IGF-IR é humano. Em outra modalidade preferencial, o anticorpo anti-IGF-IR é um anticorpo humano. Em outra modalidade, o anticorpo ou porção do mesmo inibe a ligação entre IGF-IR e IGF-I com uma IC₅₀ de não mais de 100 nM. Em uma modalidade preferencial, a IC₅₀ é não mais de 10 nM. Em uma modalidade mais preferencial, a IC₅₀ é não mais de 5 nM. A IC₅₀ pode ser medida por qualquer método conhecido na técnica. Tipicamente, uma IC₅₀ pode ser medida por ELISA ou RIA. Em uma modalidade preferencial, a IC₅₀ é medida por RIA.

Em outra modalidade, a invenção fornece um anticorpo anti-IGF-IR que evita a ativação do IGF-IR na presença de IGF-I. Em uma modalidade preferencial, o anticorpo anti-IGF-IR inibe a fosforilação de tirosina induzida por IGF-IR que ocorre na ocupação do receptor. Em outra modalidade preferencial, o anticorpo anti-IGF-IR inibe que ocorram eventos celulares a jusante. Por exemplo, o anti-IGF-IR pode inibir a fosforilação de tirosina de Shc e substrato receptor de insulina (IRS) 1 e 2, todos os quais são normalmente fosforilados quando as células são tratadas com IGF-I (Kim et al., J. Biol. Chem. 273: 34543 - 34550, 1998). Pode-se determinar se um anticorpo anti-IGF-IR pode evitar a ativação de IGF-IR na presença de IGF-1 determinando os níveis de autofosforilação para IGF-IR, Shc, IRS-1 ou IRS-2 por

meio de Western blot ou imunoprecipitação. Em uma modalidade preferencial, se determinaria os níveis de autofosforilação de IGF-IR por meio de Western blot. Ver, por exemplo, o Exemplo VII.

Em outro aspecto da invenção, o anticorpo causa a baixa regula-

- 5 lação de IGF-IR de uma célula tratada com o anticorpo. Em uma modalidade, o IGF-IR é internalizado no citoplasma da célula. Após o anticorpo anti-IGF-IR ligar a IGF-IR, o anticorpo é internalizado, como mostrado por meio de microscopia confocal. Sem desejar ser limitado a qualquer teoria, acredita-se que o complexo anticorpo-IGF-IR seja internalizado em um lisossoma e
10 degradado. Pode-se medir a baixa regulação de IGF-IR por meio de quaisquer métodos conhecidos na técnica inclusive imunoprecipitação, microscopia confocal ou Western blot. Ver, por exemplo, o Exemplo VII. Em uma modalidade preferencial, o anticorpo é selecionado 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, ou 6.1.1, ou compreende uma cadeia pesada, cadeia leve ou região
15 de ligação de antígeno da mesma.

Ativação de IGF-IR por Anticorpo Anti-IGF-IR

Outro aspecto da presente invenção envolve anticorpos ativantes anti-IGF-IR. Um anticorpo ativante difere de um anticorpo inibidor porque amplifica ou substitui os efeitos de IGF-I sobre IGF-IR. Em uma modalidade,
20 o anticorpo ativante é capaz de ligar a IGF-IR e fazer com que esta seja ativada na ausência de IGF-I. Este tipo de anticorpo ativante é essencialmente um mímico de IGF-I. Em outra modalidade, o anticorpo ativante amplifica o efeito de IGF-I sobre IGF-IR. Este tipo de anticorpo não ativa IGF-IR por si só, mas ao invés aumenta a ativação de IGF-IR na presença de IGF-I. Um
25 mímico de anticorpo anti-IGF-IR pode ser facilmente diferenciado de um anticorpo anti-IGF-IR de amplificação tratando células *in vitro* com um anticorpo na presença ou na ausência de baixos níveis de IGF-I. Se o anticorpo for capaz de causar a ativação de IGF-IR na ausência de IGF-I, por exemplo, aumentar a fosforilação por tirosina de IGF-IR, então o anticorpo é um mímico de anticorpo. Se o anticorpo não puder causar a ativação de IGF-IR na ausência de IGF-I mas for capaz de amplificar a quantidade de ativação de
30 IGF-IR, então o anticorpo é um anticorpo amplificante. Em uma modalidade

preferencial, o anticorpo ativante é 4.17.3. Em outra modalidade preferencial, o anticorpo compreende um ou mais CDRs de 4.17.3. Em outra modalidade preferencial, o anticorpo é derivado de qualquer ou ambas as seqüências da linhagem-germinativa O12 (cadeia leve) e/ou D71 (cadeia pesada).

5 **Inibição da Fosforilação de Tirosina de IGF-IR, Níveis de IGF-IR e Crescimento de Células Tumorais *In Vivo* por Anticorpos Anti-IGF-IR**

Outra modalidade da invenção fornece um anticorpo anti-IGF-IR que inibe a fosforilação por tirosina de IGF-IR e os níveis de receptor *in vivo*. Em uma modalidade, a administração de anticorpo anti-IGF-IR em um animal causa uma redução no sinal de IGF-IR fosfotirosina em tumores expressando IGF-IR. Em uma modalidade preferencial, o anticorpo anti-IGF-IR causa uma redução no sinal de fosfotirosina de no mínimo 20 %. Em uma modalidade mais preferencial, o anticorpo anti-IGF-IR causa uma redução no sinal de fosfotirosina de no mínimo 60 %, mais preferencialmente 50 %. Em 10 uma modalidade ainda mais preferencial, o anticorpo causa uma redução no sinal de fosfotirosina de no mínimo 40 %, mais preferencialmente 30 %, ainda mais preferencialmente 20 %. Em uma modalidade preferencial, o anticorpo é administrado cerca de 24 horas antes dos níveis de fosforilação por tirosina serem medidos. Os níveis de fosforilação por tirosina podem ser 15 medidos por qualquer método conhecido na técnica, tal como os descritos abaixo. Ver, por exemplo, o Exemplo III e a Figura 5. Em uma modalidade preferencial, o anticorpo é selecionado entre 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, ou 6.1.1, ou compreende uma cadeia pesada, cadeia leve ou porção 20 de ligação de antígeno do mesmo.

25 Em outra modalidade, a administração do anticorpo anti-IGF-IR a um animal causa uma redução nos níveis de IGF-IR em tumores expressando IGF-IR. Em uma modalidade preferencial, o anticorpo anti-IGF-IR causa uma redução nos níveis de receptor de no mínimo 20 % comparado com um animal não tratado. Em uma modalidade mais preferencial, o anticorpo anti-IGF-IR causa uma redução nos níveis de receptor para no mínimo 30 60 %, mais preferencialmente 50 % dos níveis de receptor em um animal não tratado. Em uma modalidade ainda mais preferencial, o anticorpo causa

uma redução nos níveis de receptor para no mínimo 40 %, mais preferencialmente 30 %. Em uma modalidade preferencial, o anticorpo é administrado cerca de 24 horas antes dos níveis de IGF-IR serem medidos. Os níveis de IGF-IR podem ser medidos por meio de qualquer método conhecido na técnica, tal como os descritos abaixo. Ver, por exemplo, o Exemplo VIII e a Figura 6. Em uma modalidade preferencial, o anticorpo é selecionado entre 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, ou 6.1.1, ou compreende uma cadeia pesada, cadeia leve ou porção de ligação de antígeno do mesmo.

Em outra modalidade, um anticorpo anti-IGF-IR inibe crescimento de células tumorais *in vivo*. A célula tumoral pode ser derivada de qualquer tipo de célula inclusive, sem limitação, células epidérmicas, epiteliais, endoteliais, de leucemia, de sarcoma, de mieloma múltiplo ou mesodérmicas. Exemplos de células tumorais incluem células A549 (pulmonar de células não-pequenas), células MCF-7, células Colo 205, células 3T3/IGF-IR e células A431. Em uma modalidade preferencial, o anticorpo inibe o crescimento de células tumorais como comparado ao crescimento do tumor em um animal não tratado. Em uma modalidade mais preferencial, o anticorpo inibe o crescimento de células tumorais por 50 %. Em uma modalidade ainda mais preferencial, o anticorpo inibe o crescimento de células tumorais por 60 %, 65 %, 70 % ou 75 %. Em uma modalidade, a inibição do crescimento de células tumorais é medida no mínimo 7 dias após os animais terem iniciado o tratamento com o anticorpo. Em uma modalidade mais preferencial, a inibição do crescimento de células tumorais é medida no mínimo 14 dias após os animais terem iniciado o tratamento com o anticorpo. Em outra modalidade preferencial, outro agente antineoplástico é administrado ao animal com o anticorpo anti-IGF-IR. Em uma modalidade preferencial, o agente antineoplástico é capaz de adicionalmente inibir o crescimento de células tumorais. Em uma modalidade ainda mais preferencial, o agente antineoplástico é adriamicina, taxol, tamoxifeno, 5-fluorodeoxiuridina (5-FU) ou CP-358.774. Em uma modalidade preferencial, a co-administração de um agente antineoplástico e do anticorpo anti-IGF-IR inibe o crescimento de células tumorais por no mínimo 50 %, mais preferencialmente 60 %, 65 %, 70 % ou 75 %,

mais preferencialmente 80 %, 85 % ou 90 % após um período de 22 - 24 dias. Ver, por exemplo, a Figura 7 e o Exemplo IX. Em uma modalidade preferencial, o anticorpo é selecionado entre 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, ou 6.1.1, ou compreende uma cadeia pesada, cadeia leve ou porção de ligação de antígeno do mesmo.

Indução de Apoptose por Anticorpos Anti-IGF-IR

Outro aspecto da invenção fornece um anticorpo anti-IGF-IR que induz a morte celular. Em uma modalidade, o anticorpo causa apoptose. O anticorpo pode induzir apoptose ou *in vivo* ou *in vitro*. De modo geral, as células tumorais são mais sensíveis à apoptose do que as células normais, de tal modo que a administração de um anticorpo anti-IGF-IR causa apoptose de uma célula tumoral preferencialmente à de uma célula normal. Em outra modalidade, a administração de um anticorpo anti-IGF-IR reduz os níveis de uma enzima, *akt*, a qual está envolvida no caminho da fosfatidil inositol (PI) quinase. O caminho da PI quinase, por sua vez, está envolvido na proliferação celular e na prevenção de apoptose. Portanto, a inibição de *akt* pode causar apoptose. Em uma modalidade mais preferencial, o anticorpo é administrado *in vivo* para causar apoptose de uma célula expressando IGF-IR. Em uma modalidade preferencial, o anticorpo é selecionado entre 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, ou 6.1.1, ou compreende uma cadeia pesada, cadeia leve ou porção de ligação de antígeno do mesmo.

Métodos para Produzir Anticorpos e Linhagens Celulares Produtoras de Anticorpos

Imunização

Em uma modalidade da presente invenção, anticorpos humanos são produzidos imunizando um animal não-humano compreendendo algum ou todo o locus de imunoglobulina humana com um antígeno de IGF-IR. Em uma modalidade preferencial, o animal não-humano é um XENOMOUSE[®], o qual é uma cepa de camundongo produzida por engenharia genética que compreende grandes fragmentos dos locais de imunoglobulina humana e é deficiente na produção de anticorpos de camundongo. Ver, por exemplo, Green et al. *Nature Genetics* 7: 13 - 21 (1994) e as Patentes dos Estados

Unidos Nos. 5.916.771, 5.939.598, 5.985.615, 5.998.209, 6.075.181, 6.091.001, 6.114.598 e 6.130.364. Ver também WO 91/10741, publicado em 25 de julho de 1991, WO 94/02602, publicado em 3 de fevereiro de 1994, WO 96/34096 e WO 96/33735, ambos publicados em 31 de outubro de 5 1996, WO 98/16654, publicado em 23 de abril de 1998, WO 98/24893, publicado em 11 de junho de 1998, WO 98/50433, publicado em 12 de novembro de 1998, WO 99/45031, publicado em 10 de setembro de 1999, WO 99/53049, publicado em 21 de outubro de 1999, WO 00 09560, publicado em 24 de fevereiro de 2000 e WO 00/037504, publicado em 29 de junho de 10 2000. O XENOMOUSE® produz um repertório de anticorpos totalmente humanos de seres humanos semelhantes a adultos, e produz Mabs humanos antígeno-específicos. Uma segunda geração XENOMOUSE® contém cerca de 80 % do repertório de anticorpos humanos através da introdução de fragmentos YAC configuração de linhagem-germinativa de tamanho mega- 15 base, dos locais de cadeia pesada humana e locais de cadeia leve κ. Ver Mendez et al. *Nature Genetics* 15: 146 - 156 (1997), Green e Jakobovits J. *Exp. Med.* 188: 483 - 495 (1998), cujas revelações são incorporadas a este relatório por meio de referência.

A invenção também fornece um método para preparar anticorpos anti-IGF-IR de animais não-camundongos, não-humanos por meio da imunização de animais transgênicos não-humanos que compreende locais de imunoglobulina humana. Pode-se produzir tais animais usando os métodos descritos imediatamente acima. Os métodos revelados nestas patentes podem ser modificados como descrito na Patente dos Estados Unidos No. 20 5.994.619. Em uma modalidade preferencial, os animais não-humanos podem ser ratos, ovelhas, porcos, cabras, gado ou cavalos.

Em outra modalidade, os animais não-humanos compreendendo locais genéticos de imunoglobulina humana são animais que têm um "minilocus" de imunoglobulinas humanas. Na abordagem do minilocus, um locus 30 de Ig exógena é simulado através da inclusão de genes individuais do locus de Ig. Portanto, um ou mais genes V_H, um ou mais genes D_H, um ou mais genes J_H, uma região constante mu, e uma segunda região constante (prefe-

rencialmente uma região constante gama) são formados em um constructo para inserção em um animal. Esta abordagem é descrita, entre outros nas Patentes dos Estados Unidos Nos. 5.545.807, 5.545.806, 5.625.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650, 5.814.318, 5 5.591.669, 5.612.205, 5.721.367, 5.789.215, e 5.643.763, incorporadas a este relatório por meio de referência.

Uma vantagem da abordagem do minilocus é a rapidez com a qual os constructos inclusive porções do locus de Ig podem ser gerados e introduzidos nos animais. No entanto, uma desvantagem potencial da abordagem do minilocus é que pode não haver suficiente diversidade de imunoglobulina para sustentar o pleno desenvolvimento de células B, de tal modo que pode haver menor produção de anticorpo.

De modo a produzir um anticorpo anti-IGF-IR humano, um animal não-humano compreendendo parte ou todos os locais de imunoglobulina humana é imunizado com um antígeno de IGF-IR e o anticorpo ou a célula produtora de anticorpos é isolado do animal. O antígeno de IGF-IR pode ser IGF-IR isolado e /ou purificado e é preferencialmente um IGF-IR humano. Em outra modalidade, o antígeno de IGF-IR é um fragmento de IGF-IR, preferencialmente o domínio extracelular de IGF-IR. Em outra modalidade, o 10 antígeno de IGF-IR é um fragmento que compreende no mínimo um epitopo de IGF-IR. Em outra modalidade, o antígeno de IGF-IR é uma célula que expressa IGF-IR sobre sua superfície celular, preferencialmente uma célula que superexpressa IGF-IR sobre sua superfície celular.

A imunização de animais pode ser feita por meio de qualquer 15 método conhecido na técnica. Ver, por exemplo, Harlow e Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990. Métodos para imunizar animais não-humanos tais como camundongos, ratos, ovelhas, cabras, porcos, gado e cavalos são de conhecimento geral na técnica. Ver, por exemplo, Harlow e Lane e a Patente dos Estados Unidos No. 20 5.994.619. Em uma modalidade preferencial, o antígeno de IGF-IR é administrado com um adjuvante para estimular a resposta imune. Tais adjuvantes incluem adjuvante de Freund completo ou incompleto, RIBI (muramidipeptí-

deos) ou ISCOM (complexos imunoestimulantes). Tais adjuvantes podem proteger o polipeptídeo contra rápida dispersão, seqüestrando-o em um depósito local, ou eles podem conter substâncias que estimulam o hospedeiro a secretar fatores que são quimiotáticos para macrófagos e outros componentes do sistema imune. Preferencialmente, se um polipeptídeo estiver sendo administrado, o esquema de imunização envolverá duas ou mais administrações do polipeptídeo, distribuídas por várias semanas.

O Exemplo I fornece um protocolo para imunizar um XENOMOUSE® com IGF-IR humano de extensão total em salina tamponada com fosfato.

Produção de Anticorpos e Linhagens Celulares Produtoras de Anticorpos

Após imunização de um animal com um antígeno de IGF-IR, anticorpos e/ou células produtoras de anticorpos podem ser obtidas do animal. Um soro contendo anticorpo anti-IGF-IR é obtido do animal sangrando ou sacrificando o animal. O soro pode ser usado à medida que é obtido do animal, uma fração de imunoglobulina pode ser obtida do soro, ou os anticorpos anti-IGF-IR podem ser purificados do soro. Soro ou imunoglobulinas obtidos desta maneira são policlonais, os quais são desvantajosos porque a quantidade de anticorpos que pode ser obtida é limitada e o anticorpo policlonal tem uma série heterogênea de propriedades.

Em outra modalidade, hibridomas imortalizados produtores de anticorpos podem ser preparados a partir do animal imunizado. Após imunização, o animal é sacrificado e as células B esplênicas são fundidas a células de mieloma imortalizadas como é de conhecido geral na técnica. Ver, por exemplo, Harlow e Lane, *supra*. Em uma modalidade preferencial, as células de mieloma não secretam polipeptídeos de imunoglobulina (uma linhagem celular não-secretora). Após fusão e seleção de antibiótico, os hibridomas são triados usando IGF-IR, uma porção do mesmo, ou uma célula expressando IGF-IR. Em uma modalidade preferencial, a triagem inicial é realizada usando um imunoensaio ligado à enzima (ELISA) ou um radioimunoensaio (RIA), preferencialmente um ELISA. Um exemplo de varredura por ELISA é fornecido em WO 00/37504, incorporado a este relatório por meio de refe-

rência.

Em outra modalidade, células produtoras de anticorpos podem ser preparadas a partir de um ser humano que tenha um distúrbio auto-imune e que expresse anticorpos anti-IGF-IR. Células expressando os anticorpos anti-IGF-IR podem ser isoladas isolando leucócitos e submetendo-os à escolha celular ativada por fluorescência (FACS) ou bateando sobre lâminas revestidas com IGF-IR ou uma porção do mesmo. Estas células podem ser fundidas com um mieloma não-secretor humano para produzir hibridomas humanos expressando anticorpos anti-IGF-IR humanos. De modo geral, esta é uma modalidade menos preferencial porque é provável que os anticorpos anti-IGF-IR tenham uma baixa afinidade para IGF-IR.

Hibridomas produtores de anticorpos anti-IGF-IR são selecionados, clonados e adicionalmente triados para características desejáveis, inclusive forte crescimento do hibridoma, alta produção de anticorpos e características desejáveis dos anticorpos, como discutido adicionalmente abaixo. Hibridomas podem ser cultivados e expandidos *in vivo* em animais sín-gênicos, em animais que carecem de um sistema imune, por exemplo, camundongos pelados, ou em cultura celular *in vitro*. Os métodos para selecionar, clonar e expandir hibridomas são de conhecimento geral daqueles versado na técnica.

Preferencialmente, o animal imunizado é um animal não-humano que expressa genes de imunoglobulina humana e as células B esplênicas são fundidas a um derivado de mieloma da mesma espécie que o animal não-humano. Mais preferencialmente, o animal imunizado é um XENO-25 MOUSE® e a linhagem celular do mieloma é um mieloma de camundongo não secretor, tal como a linhagem celular de mieloma é NSO-bcl2. Ver, por exemplo, o Exemplo I.

Em um aspecto, a invenção fornece hibridomas que são produzidos, que produzem anticorpos anti-IGF-IR humanos. Em uma modalidade preferencial, os hibridomas são hibridomas de camundongo, como descrito acima. Em outra modalidade preferencial, os hibridomas são produzidos em uma espécie não-humana, não-camundongo tal como ratos, ovelhas, por-

cos, cabras, gado ou cavalos. Em outra modalidade, os hibridomas são hibridomas humanos, nos quais um mieloma não secretor humano é fundido com uma célula humana expressando um anticorpo anti-IGF-IR.

Ácidos Nucléicos, Vetores, Células Hospedeiras e Métodos Recombinantes

5 para Preparar Anticorpos

Ácidos Nucléicos

São fornecidas moléculas de ácidos nucléicos codificando anticorpos anti-IGF-IR da invenção. Em uma modalidade, a molécula de ácido nucléico codifica uma cadeia pesada e/ou leve de uma imunoglobulina anti-IGF-IR. Em uma modalidade preferencial, uma única molécula de ácido nucléico codifica uma cadeia pesada de uma imunoglobulina anti-IGF-IR e outra molécula de ácido nucléico codifica a cadeia leve de uma imunoglobulina anti-IGF-IR. Em uma modalidade mais preferencial, a imunoglobulina codificada é uma imunoglobulina humana, preferencialmente uma IgG humana. A cadeia leve codificada pode ser uma cadeia λ ou uma cadeia κ , preferencialmente uma cadeia κ .

A molécula de ácido nucléico codificando a região variável da cadeia leve pode ser derivada do gene A30, A27 ou O12 V κ . Em uma modalidade preferencial, a cadeia leve é derivada do gene A30 V κ . Em outra modalidade preferencial, a molécula de ácido nucléico codificando a cadeia leve compreende a região de união derivada de J κ 1, J κ 2 or J κ 4. Em uma modalidade ainda mais preferencial, a molécula de ácido nucléico codificando a cadeia leve contém não mais de dez alterações de aminoácidos do gene da linhagem-germinativa A30 V κ , preferencialmente não mais de seis alterações de aminoácidos, e ainda mais preferencialmente não mais de três alterações de aminoácido.

A invenção fornece uma molécula de ácido nucléico que codifica uma região variável da cadeia leve (VL) contendo no mínimo três alterações de aminoácidos comparada com a seqüência da linhagem-germinativa, em que as alterações de aminoácidos são idênticas às alterações de aminoácidos da seqüência da linhagem-germinativa do VL de um dos anticorpos 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1. A invenção também for-

nece uma molécula de ácido nucléico compreendendo uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica a seqüência de aminoácidos da região variável da cadeia leve de 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1, A invenção também fornece uma molécula de ácido nucléico compreendendo 5 uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica a seqüência de aminoácidos de um ou mais dos CDRs de qualquer uma das cadeias leves de 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1. Em uma modalidade preferencial, a molécula de ácido nucléico compreende uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica a seqüência de aminoácidos de todos os CDRs de qual- 10 quer uma das cadeias leves de 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1. Em outra modalidade, a molécula de ácido nucléico compreende uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica a seqüência de aminoácidos de uma das SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18 ou 22 ou compreende uma seqüência 15 de ácidos nucléicos de uma das SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 13, 17 ou 21. Em outra modalidade preferencial, a molécula de ácido nucléico compreende uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica a seqüência de aminoácidos de um ou mais dos CDRs de qualquer uma das SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18 ou 22 ou compreende uma seqüência de ácidos nucléicos de um ou mais dos CDRs de qualquer uma das SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 13, 17 ou 21. Em uma 20 modalidade mais preferencial, a molécula de ácido nucléico compreende uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica a seqüência de aminoácidos de todos os CDRs de qualquer uma das SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18 ou 22 ou compreende uma seqüência de ácidos nucléicos de todos os CDRs de qualquer uma das SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 13, 17 ou 21.

25 A invenção também fornece uma molécula de ácidos nucléicos que codifica uma seqüência de aminoácidos de um VL que tem uma seqüência de aminoácidos que tem no mínimo 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % idêntica a um VL descrito acima, particu- larmente a um VL que compreende uma seqüência de aminoácidos de uma 30 das SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18 ou 22. A invenção também fornece uma seqüência de ácidos nucléicos que tem no mínimo 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % idêntica a uma seqüência de ácidos

nucléicos de uma das SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 13, 17 ou 21. Em outra modalidade, a invenção fornece uma molécula de ácido nucléico codificando um VL que hibridiza sob condições altamente rigorosas a uma molécula de ácido nucléico codificando um VL como descrito acima, particularmente uma molécula de ácido nucléico que compreende uma seqüência de ácidos nucléicos codificando uma seqüência de aminoácidos da SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18 ou 22. A invenção também fornece uma seqüência de ácidos nucléicos codificando um VL que hibridiza sob condições altamente rigorosas a uma molécula de ácido nucléico compreendendo uma seqüência de ácidos nucléicos de uma das SEQ ID NOS: 1, 5, 9, 13, 17 ou 21.

A invenção também fornece uma molécula de ácido nucléico codificando a região variável da cadeia pesada (VH) é derivada do gene DP-35, DP-47, DP-71 ou VIV-4/4.35 VH, preferencialmente o gene DP-35 VH. Em outra modalidade preferencial, a molécula de ácido nucléico codificando o VH compreende a região de união derivada de JH6 ou JH5, mais preferencialmente JH6. Em outra modalidade preferencial, o D segmento é derivado de 3-3, 6-19 or 4-17. Em uma modalidade ainda mais preferencial, a molécula de ácido nucléico codificando o VH contém não mais de dez alterações de aminoácidos do gene da linhagem-germinativa DP-47, preferencialmente não mais de seis alterações de aminoácidos, e ainda mais preferencialmente não mais de três alterações de aminoácidos. Em uma modalidade altamente preferencial, a molécula de ácido nucléico codificando o VH contém no mínimo uma alteração de aminoácido comparada com a seqüência da linhagem-germinativa, em que a alteração de aminoácido é idêntica à alteração de aminoácido da seqüência da linhagem-germinativa da cadeia pesada de um dos anticorpos 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1. Em uma modalidade ainda mais preferencial, o VH contém no mínimo três alterações de aminoácidos comparada com as seqüências da linhagem-germinativa, em que as alterações são idênticas às alterações da seqüência da linhagem-germinativa do VH de um dos anticorpos 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1.

Em uma modalidade, a molécula de ácido nucléico compreende

uma seqüência de ácido nucléico que codifica a seqüência de aminoácidos do VH de 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1. Em outra modalidade, a molécula de ácido nucléico compreende uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica a seqüência de aminoácidos de um ou mais dos CDRs da cadeia pesada de 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1. Em uma modalidade preferencial, a molécula de ácido nucléico compreende uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica as seqüências de aminoácidos de todos os CDRs da cadeia pesada de 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1. Em outra modalidade preferencial, a molécula de ácido nucléico compreende uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica a seqüência de aminoácidos de uma das SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20 ou 24 ou que compreende uma seqüência de ácidos nucléicos de uma das SEQ ID NOS: 3, 7, 11, 15, 19 ou 23. Em outra modalidade preferencial, a molécula de ácido nucléico compreende uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica a seqüência de aminoácidos de um ou mais dos CDRs de qualquer uma das SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20 ou 24 ou compreende uma seqüência de ácidos nucléicos de um ou mais dos CDRs de qualquer uma das SEQ ID NOS: 3, 7, 11, 15, 19 ou 23. Em uma modalidade preferencial, a molécula de ácido nucléico compreende uma seqüência de ácidos nucléicos que codifica as seqüências de aminoácidos de todos os CDRs de qualquer uma das SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20 ou 24 ou compreende uma seqüência de ácidos nucléicos de todos os CDRs de qualquer uma das SEQ ID NOS: 3, 7, 11, 15, 19 ou 23.

Em outra modalidade, a molécula de ácido nucléico codifica uma seqüência de aminoácidos de um VH que é no mínimo 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % idêntica a uma das seqüências de aminoácidos codificando um VH como descrito imediatamente acima, particularmente a um VH que compreende uma seqüência de aminoácidos de uma das SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20 ou 24. A invenção também fornece uma seqüência de ácidos nucléicos que é no mínimo 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % ou 99 % idêntica a uma seqüência de ácidos nucléicos de uma das SEQ ID NOS: 3, 7, 11, 15, 19 ou 23. Em outra

modalidade, a molécula de ácido nucléico codificando um VH é uma que hibridiza sob condições altamente rigorosas a uma seqüência de ácidos nucléicos codificando um VH como descrito acima, particularmente a um VH que compreende uma seqüência de aminoácidos de uma das SEQ ID NOS:

- 5 4, 8, 12, 16, 20 ou 24. A invenção também fornece uma seqüência de ácidos nucléicos codificando um VH que hibridiza sob condições altamente rigorosas a uma molécula de ácido nucléico compreendendo uma seqüência de ácidos nucléicos de uma das SEQ ID NOS: 3, 7, 11, 15, 19 ou 23.

A molécula de ácido nucléico codificando qualquer uma ou am-

- 10 bas as cadeias pesadas e leves inteiras de um anticorpo anti-IGF-IR ou as regiões variáveis dos mesmos pode ser obtida de qualquer fonte que produza um anticorpo anti-IGF-IR. Métodos para isolar mRNA codificando um anticorpo são de conhecimento geral na técnica. Ver, por exemplo, Sambrook et al. O mRNA pode ser usado para produzir cDNA para aplicação na reação 15 de cadeia polimerase (PCR) ou clonagem de cDNA dos genes do anticorpo. Em uma modalidade da invenção, as moléculas de ácido nucléico podem ser obtidas de um hibridoma que expressa um anticorpo anti-IGF-IR, como descrito acima, preferencialmente um hibridoma que tem como um de seus parceiros de fusão uma célula de animal transgênico que expressa genes de 20 imunoglobulina humana, tais como um XENOMOUSE®, animal transgênico de camundongo não-humano ou um animal transgênico não-humano, não camundongo. Em outra modalidade, o hibridoma é derivado de um animal não transgênico, não-humano, que pode ser usado, por exemplo, para anticorpos humanizados.

- 25 Uma molécula de ácido nucléico codificando toda a cadeia pesada de um anticorpo anti-IGF-IR pode ser construída fundindo uma molécula de ácido nucléico codificando o domínio variável de uma cadeia pesada ou um domínio de ligação de antígeno do mesmo com um domínio constante de uma cadeia pesada. Do mesmo modo, uma molécula de ácido nucléico 30 codificando a cadeia leve de um anticorpo anti-IGF-IR pode ser construída fundindo uma molécula de ácido nucléico codificando o domínio variável de uma cadeia leve ou um domínio de ligação de antígeno do mesmo com um

domínio constante de uma cadeia leve. A molécula de ácidos nucléicos codificando a cadeia VH e VL pode ser convertida para genes de anticorpo de extensão total inserindo os mesmos em vetores de expressão já codificando regiões constantes de cadeia pesada e constantes de cadeia leve, respectivamente, de tal modo que o segmento VH seja ligado operativamente ao segmento ou segmentos da região constante de cadeia pesada (CH) dentro do vetor e o segmento VL é ligado operativamente ao segmento da região constante de cadeia leve (CL) dentro do vetor. Alternativamente, as moléculas de ácido nucléico codificando as cadeias VH ou VL são convertidas em genes de anticorpo de extensão total encadeando, por exemplo, ligando , a molécula de ácido nucléico codificando uma cadeia VH a uma molécula de ácido nucléico codificando uma cadeia CH usando técnicas de biologia molecular de rotina. O mesmo pode ser realizado usando moléculas de ácidos nucléicos codificando cadeias VL e CL. As seqüências de genes de regiões constantes de cadeia pesada e de cadeia leve são conhecida na técnica. Ver, por exemplo, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed., NIH Publ. No. 91 - 3242, 1991. Moléculas de ácido nucléico codificando as cadeias pesadas e/ou leves de extensão total podem ser então expressas a partir de uma célula na qual elas foram introduzidas e o anticorpo anti-IGF-IR isolado.

Em uma modalidade preferencial, o ácido nucléico codificando a região variável da cadeia pesada codifica a seqüência de aminoácidos da SEQ ID NOS: 4, 8, 12, 16, 20 ou 24, e a molécula de ácido nucléico codificando a região variável das cadeias leves codifica a seqüência de aminoácidos da SEQ ID NOS: 2, 6, 10, 14, 18 ou 22. A SEQ ID NO: 28 representa a seqüência de aminoácidos e a SEQ ID NO: 27 representa a seqüência de ácidos nucléicos codificando a região constante da cadeia pesada dos anticorpos anti-IGF-IR 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 e 6.1.1. A SEQ ID NO: 26 representa a seqüência de aminoácidos e a SEQ ID NO: 25 representa a seqüência de ácidos nucléicos codificando a região constante da cadeia leve dos anticorpos anti-IGF-IR 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 e 6.1.1. Portanto, em uma modalidade preferencial, a molécula de

ácido nucléico codificando o domínio constante da cadeia pesada codifica SEQ ID NO: 28, e a molécula de ácido nucléico codificando o domínio constante da cadeia leve codifica a SEQ ID NO: 26. Em uma modalidade mais preferencial, a molécula de ácido nucléico codificando o domínio constante da cadeia pesada tem o ácido nucléico seqüência da SEQ ID NO: 27, e a molécula de ácido nucléico codificando o domínio constante tem o ácido nucléico seqüência da SEQ ID NO: 25.

Em outra modalidade, uma molécula de ácido nucléico codificando ou a cadeia pesada de um anticorpo anti-IGF-IR ou um domínio de ligação de antígeno do mesmo, ou a cadeia leve de um anticorpo anti-IGF-IR ou um domínio de ligação de antígeno do mesmo pode ser isolada de um animal não-humano, não camundongo que expressa genes de imunoglobulina humana e foi imunizado com um antígeno de IGF-IR. Em outra modalidade, a molécula de ácido nucléico pode ser isolada de uma célula produtora de anticorpo anti-IGF-IR derivada de um animal não transgênico ou de um humano paciente o qual produza anticorpos anti-IGF-IR. Os métodos para isolar RNAm das células produtoras de anticorpo anti-IGF-IR podem ser isolados por meio de técnicas de rotina, clonadas e/ou amplificadas usando PCR e técnicas de construção de biblioteca, e triadas usando protocolos de rotina para obter moléculas de ácidos nucléicos codificando cadeias pesadas e leves anti-IGF-IR.

A molécula de ácidos nucléicos pode ser usada para expressar de modo recombinante grandes quantidades de anticorpos anti-IGF-IR, como descrito abaixo. A molécula de ácidos nucléicos também pode ser usada para produzir anticorpos quiméricos, anticorpos de cadeia única, imunoadesinas, diacorpos, anticorpos mutados e derivados de anticorpos, como descrito adicionalmente abaixo. Se as moléculas de ácido nucléico forem derivadas de um animal não transgênico, não-humano, as moléculas de ácido nucléico podem ser usadas para humanização de anticorpos, também como descrito abaixo.

Em outra modalidade, as moléculas de ácido nucléico da invenção podem ser usadas como sondas ou ligantes de PCR para seqüências de

anticorpos específicas. Por exemplo, uma sonda de molécula de ácido nucléico pode ser usada em métodos diagnósticos ou um ligante de PCR de molécula de ácido nucléico pode ser usado para amplificar regiões de DNA que podem ser usadas, entre outros, para isolar seqüências de ácidos nucléicos para uso na produção de domínios variáveis de anticorpos anti-IGF-IR. Em uma modalidade preferencial, as moléculas de ácido nucléico são oligonucleotídeos. Em uma modalidade mais preferencial, os oligonucleotídeos são de regiões altamente variáveis das cadeias pesadas e leves do anticorpo de interesse. Em uma modalidade ainda mais preferencial, os oligonucleotídeos codificam todos ou uma parte de um ou mais dos CDRs.

Vetores

A invenção fornece vetores compreendendo as moléculas de ácido nucléico da invenção que codificam a cadeia pesada ou a porção de ligação de antígeno do mesmo. A invenção também fornece vetores compreendendo as moléculas de ácido nucléico da invenção que codificam a cadeia leve ou porção de ligação de antígeno do mesmo. A invenção também fornece vetores compreendendo moléculas de ácidos nucléicos codificando proteínas de fusão, anticorpos modificados, fragmentos de anticorpos, e sondas das mesmas.

Para expressar os anticorpos, ou porções de anticorpos da invenção, DNAs codificando cadeias leves e pesadas de extensão parcial ou total, obtidos como descrito acima, são inseridos em vetores de expressão de tal modo que os genes são ligados operativamente a seqüências de controle transcricionais e translacionais. Vetores de expressão incluem plasmídeos, retrovírus, cosmídeos, YACs, episomas derivados de EBV, e semelhantes. O gene do anticorpo é ligado em um vetor de tal modo que seqüências de controle transcricionais e translacionais dentro do vetor servem sua função pretendida de regular a transcrição e a translação do gene do anticorpo. O vetor de expressão e seqüências de controle da expressão são escolhidos para serem compatíveis com a célula hospedeira de expressão usada. O gene de cadeia leve do anticorpo e o gene de cadeia pesada do anticorpo podem ser inseridos em vetores separados. Em uma modalidade

preferencial, ambos os genes são inseridos no mesmo vetor de expressão.

Os genes do anticorpo são inseridos no vetor de expressão por meio de métodos de rotina (por exemplo, ligação de sítios de restrição complementares sobre o fragmento do gene do anticorpo vetor, ou ligação de embota-

5 mento se não houver presentes sítios de restrição).

Um vetor conveniente é um que codifica uma seqüência de imunoglobulina humana CH ou CL funcionalmente completa, com sítios de restrição adequados produzidos por engenharia genética de modo que qualquer seqüência VH ou VL pode ser facilmente inserida e expressa, como

10 descrito acima. Em tais vetores, geralmente ocorre ligação entre o sítio doador de junção na região J inserida e o sítio aceitador de junção precedendo a região C humana, e também nas regiões de junção que ocorrem dentro dos exons CH humanos. Ocorre poliadenilação e terminação de transcrição nos

15 sítios cromossômicos naturais a jusante das regiões codificantes. O vetor de expressão recombinante também pode codificar um peptídeo de sinal que facilita a secreção da cadeia do anticorpo de uma célula hospedeira. O gene da cadeia do anticorpo pode ser clonado no vetor de tal modo que o peptídeo de sinal seja ligado na estrutura ao término amino do gene da cadeia do anticorpo. O peptídeo de sinal pode ser um peptídeo de sinal de imunoglo-

20 bulina ou um peptídeo de sinal heterólogo (isto é, um peptídeo de sinal de uma proteína não imunoglobulina).

Além dos genes da cadeia do anticorpo, os vetores de expressão recombinantes da invenção carregam seqüências reguladoras que controlam a expressão dos genes da cadeia do anticorpo em uma célula hospedeira. Será reconhecido por aqueles versados na técnica que o projeto do vetor de expressão, inclusive a seleção das seqüências reguladoras pode depender de fatores tais como a escolha da célula hospedeira a ser transformada, do nível de expressão da proteína desejada, etc. Seqüências reguladoras preferenciais para expressão de célula hospedeira de mamífero

25 incluem elementos virais que orientam altos níveis de expressão de proteína em células de mamíferos, tais como estimuladores e/ou reforçadores derivados de LTRs retrovirais, citomegalovírus (CMV) (tal como o estimula-

dor/reforçador de CMV), Simian Vírus 40 (SV40) (tal como o estimulador/reforçador de SV40), adenovírus, (por exemplo, o principal e tardio estimulador de adenovírus (AdMLP)), estimuladores de polioma e forte estimuladores de mamíferos tais como imunoglobulina nativa e estimuladores de actina. Para descrição adicional de elementos viral reguladores virais, e seqüências dos mesmos, ver por exemplo, a Patente dos Estados Unidos No. 5.168.062 de Stinski, a Patente dos Estados Unidos No. 4.510.245 de Bell et al. e a Patente dos Estados Unidos 4.968.615 de Schaffner et al.

Além dos genes da cadeia do anticorpo e das seqüências reguladoras, os vetores de expressão recombinantes da invenção podem carregar seqüências adicionais, tais como seqüências que regulam a replicação do vetor em células hospedeiras (por exemplo, origens de replicação) e genes marcadores selecionáveis. O gene marcador selecionável facilita a seleção de células hospedeiras nas quais o vetor foi introduzido (ver por exemplo, as Patentes dos Estados Unidos Nos. 4.399.216, 4.634.665 e 5.179.017, todas de Axel et al.). Por exemplo, tipicamente o gene marcador selecionável confere resistência a drogas, tais como G418, higromicina ou metotrexato, sobre uma célula hospedeira na qual o vetor foi introduzido. Genes marcadores selecionáveis preferenciais incluem o gene diidrofolate redutase (DHFR) (para uso em células dhfr- hospedeiras com seleção/amplificação de metotrexato) e o neo gene (para seleção de G418).

Células Hospedeiras Não Hibridoma e Métodos para Produzir Proteínas de modo Recombinante

Moléculas de ácido nucléico codificando a cadeia pesada ou uma porção de ligação de antígeno da mesma e/ou a cadeia leve ou uma porção de ligação de antígeno da mesma de um anticorpo anti-IGF-IR, e vetores compreendendo estas moléculas de ácidos nucléicos, podem ser usadas para transformação de algumas células hospedeiras de mamífero adequadas. A transformação pode ser por meio de qualquer método conhecido para introduzir polinucleotídeos em uma célula hospedeira. Os métodos para introdução de polinucleotídeos heterólogos em células de mamíferos são de conhecimento geral na técnica e incluem transfecção mediada por

dextrano, precipitação de fosfato de cálcio, transfecção mediada por polibre-
no, fusão de protoplasto, eletroporação, encapsulação do polinucleotídeo ou
polinucleotídeos em lipossomas, injeção biolística e microinjeção direta do
DNA nos núcleos. Além disso, moléculas de ácidos nucléicos podem ser
5 introduzidas em células de mamíferos por vetores virais. Os métodos para
transformar células são de conhecimento geral na técnica. Ver, por exemplo,
as Patentes dos Estados Unidos Nos. 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461, and
4.959.455 (cujas patentes são por meio deste incorporadas a este relatório
por meio de referência).

10 Linhagens celulares de mamíferos disponíveis como hospedei-
ros para expressão são de conhecimento geral na técnica e incluem muitas
linhagens celulares imortalizadas disponíveis na *American Type Culture Co-*
llection (ATCC). Estas incluem, entre outras, células de ovário de hamster
chinês (CHO), NSO, células SP2, células HeLa, células renais de filhote
15 hamster (BHK), células renais de macaco (COS), células de carcinoma he-
patocelular humano (por exemplo, Hep G2), células A549, células 3T3, e
uma série de outras linhagens celulares. Células hospedeiras de mamíferos
incluem células humanas, de camundongo, de rato, de cachorro, de macaco,
de porco, de cabra, bovinas, de cavalo e de hamster. Linhagens celulares de
20 particular preferência são selecionadas através da determinação de quais
linhagens celulares têm altos níveis de expressão. Outras linhagens celula-
res que podem ser usadas são linhagens de células de inseto, tais como
células Sf9, células de anfíbio, células bacterianas, células de plantas e cé-
lulas fúngicas. Quando vetores de expressão recombinante codificando a
25 cadeia pesada ou porção de ligação de antígeno do mesmo, a cadeia leve
e/ou porção de ligação de antígeno do mesmo são introduzidos em células
hospedeiras de mamíferos, os anticorpos são produzidos cultivando as cé-
lulas hospedeiras por um período de tempo suficiente para possibilitar a ex-
pressão do anticorpo nas células hospedeiras ou, mais preferencialmente, a
30 secreção do anticorpo no meio de cultura no qual as células hospedeiras são
cultivadas. Anticorpos podem ser recuperados do meio de cultura usando
métodos de purificação de proteína de rotina.

Além disso, expressão de anticorpos da invenção (ou outras porções dos mesmos) da produção de linhagens celulares pode ser reforçada usando uma série de técnicas conhecidas. Por exemplo, o sistema de expressão genética de glutamina sintetase (o sistema GS) é uma abordagem comum para reforçar a expressão sob certas condições. O sistema GS é discutido no todo ou em parte em conexão com as Patentes Européias Nos. 0 216 846, 0 256 055, e 0 323 997 e o Pedido de Patente Europeu No. 89303964.4.

É provável que anticorpos expressos por diferentes linhagens celulares ou em animais transgênicos terão diferente glicosilação um do outro. No entanto, todos os anticorpos codificados pelas moléculas de ácidos nucléicos proporcionadas neste relatório, ou compreendendo as seqüências de aminoácidos providas neste relatório são parte da presente invenção, indiferente da glicosilação dos anticorpos.

15 Animais Transgênicos

A invenção também fornece animais transgênicos não-humanos compreendendo uma ou mais moléculas de ácidos nucléicos da invenção que podem ser usadas para produzir anticorpos da invenção. Os anticorpos podem ser produzidos nos e recuperados dos tecidos ou fluidos corporais, 20 tais como leite, sangue ou urina, de cabras, vacas, cavalos, porcos, ratos, camundongos, coelhos, hamsters ou outros mamíferos. Ver, por exemplo, as Patentes dos Estados Unidos Nos. 5.827.690, 5.756.687, 5.750.172, e 25 5.741.957. Conforme descrito acima, animais transgênicos não-humanos que compreendem locais de imunoglobulina humana podem ser produzidos imunizando com IGF-IR ou uma porção do mesmo.

Em outra modalidade, animais transgênicos não-humanos são produzidos introduzindo uma ou mais moléculas de ácidos nucléicos da invenção no animal por meio de técnicas transgênicas de rotina. Ver Hogan, *supra*. As células transgênicas usadas para preparar o animal transgênico 30 podem ser células do tronco embrionário ou células somáticas. Os organismos transgênicos não-humanos podem ser heterozigotos quiméricos, não quiméricos, e homozigotos não quiméricos. Ver, por exemplo, Hogan *et al.*,

Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual 2ed., Cold Spring Harbor Press (1999); Jackson *et al.*, Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach, Oxford University Press (2000); e Pinkert, Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook, Academic Press (1999). Em 5 outra modalidade, os organismos transgênicos não-humanos podem ter uma ruptura orientada e substituição que codifica uma cadeia pesada e/ou uma cadeia leve de interesse. Em uma modalidade preferencial, os animais transgênicos compreendem e expressam moléculas de ácidos nucléicos codificando cadeias pesadas e leves que ligam especificamente a IGF-IR, 10 preferencialmente IGF-IR humano. Em outra modalidade, os animais transgênicos compreendem moléculas de ácidos nucléicos codificando um anticorpo modificado tal como um anticorpo de cadeia única, um anticorpo quimérico ou um anticorpo humanizado, Os anticorpos anti-IGF-IR podem ser preparados em qualquer animal transgênico. Em uma modalidade preferencial, 15 os animais não-humanos são camundongos, ratos, ovelhas, porcos, cabras, gado ou cavalos. O animal transgênico não-humano expressa os referidos polipeptídeos codificados no sangue, no leite, na urina, na saliva, nas lágrimas, em muco e outros fluidos corporais.

Bibliotecas de Amostras de Fagos

20 A invenção fornece um método para produzir um anticorpo anti-IGF-IR ou porção de ligação de antígeno do mesmo compreendendo as etapas de sintetizar uma biblioteca de anticorpos humanos sobre fago, triando a biblioteca com um IGF-IR ou uma porção do mesmo, isolando fago que liga IGF-IR, e obtendo o anticorpo do fago. Um método para preparar a biblioteca 25 de anticorpos compreende as etapas de imunizar um animal hospedeiro não-humano compreendendo um locus de imunoglobulina humana com IGF-IR ou uma porção antigênica do mesmo para criar uma resposta imune, extraír células das células do animal hospedeiro que são responsáveis pela produção de anticorpos; isolar RNA das células extraídas, transcrição reversa do RNA para produzir cDNA, amplificação do cDNA usando um ligante, e inserção do cDNA em vetor de amostra de fago de tal modo que os anticorpos 30 sejam expressos sobre o fago. Anticorpos anti-IGF-IR recombinantes da

invenção podem ser obtidos deste modo.

Anticorpos humanos anti-IGF-IR recombinantes da invenção além dos anticorpos anti-IGF-IR descrito neste relatório podem ser isolados por meio de triagem de uma biblioteca de anticorpo combinatorial recombinante, preferencialmente uma biblioteca de amostra de fago scFv, preparada usando cDNAs de VL e VH humano preparado a partir de derivado de RNAm de linfócitos humanos. Metodologias para preparar e triar tais bibliotecas são de conhecimento na técnica. Existem kits comercialmente disponíveis para produzir bibliotecas de amostras de fago (por exemplo, o Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, catálogo no. 27-9400-01; e o kit de amostras de fago Stratagene SurfZAP®, catálogo no. 240612). Existem também outros métodos e reagentes que podem ser usados para produzir e triar bibliotecas de amostras de anticorpos (ver, por exemplo, Ladner et al. Patente dos Estados Unidos No. 5.223.409; Kang et al. Publicação Internacional PCT No. WO 92/18619; Dower et al. Publicação Internacional PCT No. WO 91/17271; Winter et al. Publicação Internacional PCT No. WO 92/20791; Markland et al. Publicação Internacional PCT No. WO 92/15679; Breitling et al. Publicação Internacional PCT No. WO 93/01288; McCafferty et al. Publicação Internacional PCT No. WO 92/01047; Garrard et al. PCT Publicação No. WO 92/09690; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9: 1370 - 1372; Hay et al. (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3: 81 - 85; Huse et al. (1989) Science 246: 1275 - 1281; McCafferty et al., Nature (1990) 348: 552 - 554; Griffiths et al. (1993) EMBO J 12: 725 - 734; Hawkins et al. (1992) J. Mol. Biol. 226: 889 - 896; Clackson et al. (1991) Nature 352: 624 - 628; Gram et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 3576 - 3580; Garrad et al. (1991) Bio/Technology 9: 1373 - 1377; Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19: 4133 - 4137; and Barbas et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7978 - 7982.

Em uma modalidade preferencial, para isolar anticorpos anti-IGF-IR humanos com as características desejadas, um anticorpo anti-IGF-IR humano como descrito neste relatório é primeiro usado para selecionar sequências de cadeias pesadas e leves humanas tendo atividade de ligação

semelhante para IGF-IR, usando os métodos de impressão de epitopo descritos em Hoogenboom et al., Publicação Internacional PCT No. WO 93/06213. As bibliotecas de anticorpos usadas neste método são preferencialmente bibliotecas de scFv preparadas e triadas como descrito em McCafferty et al., Publicação Internacional PCT No. WO 92/01047, McCafferty et al., Nature (1990) 348: 552 - 554; e Griffiths et al., (1993) EMBO J 12: 725 - 734. As bibliotecas de anticorpos scFv preferencialmente são triadas usando IGF-IR humano como o antígeno.

Alguns segmentos iniciais humanos VL e VH são selecionados, 10 experimentos "misturados e combinados", nos quais diferentes pares dos segmentos iniciais VL e VH selecionados inicialmente são triados para ligação de IGF-IR, são feitos para selecionar combinações de pares VL/VH preferenciais. Adicionalmente, para ainda melhorar a qualidade do anticorpo, os segmentos VL e VH do par ou pares VL/VH preferenciais podem ser mutados aleatoriamente, preferencialmente dentro da região CDR3 de VH e/ou VL, em um processo análogo ao processo de mutação somática *in vivo* responsável por maturação de afinidade de anticorpos durante uma resposta imune natural. Esta maturação de afinidade *in vitro* pode ser realizada amplificando as regiões VH e VL usando ligantes de PCR complementares ao VH 15 CDR3 ou VL CDR3, respectivamente, cujos ligantes foram "testadas" com uma mistura aleatória das quatro bases de nucleotídeos em determinadas posições de tal modo que os produtos de PCR resultantes codificam segmentos VH e VL nos quais foram introduzidas mutações aleatórias nas regiões VH e/ou VL CDR3. Estes segmentos VH e VL mutados aleatoriamente 20 25 podem ser retriados para ligação a IGF-IR,

Após triagem e isolamento de um anticorpo anti-IGF-IR da invenção de uma biblioteca de amostras de imunoglobulina recombinante, ácido nucléico codificando o anticorpo selecionado pode ser recuperado do pacote de amostras (por exemplo, do genoma do fago) e subclonado em outros 30 vetores de expressão por meio de técnicas de DNA recombinante de rotina. Se desejado, o ácido nucléico pode ser ainda manipulado para criar outras formas de anticorpos da invenção, como descrito abaixo. Para expressar um

anticorpo humano recombinante isolado por varredura de uma biblioteca combinatorial, o DNA codificando o anticorpo é clonado em um vetor de expressão recombinante e introduzido em algumas células hospedeiras de mamíferos, como descrito acima.

5 Permuta de Classe

Outro aspecto da presente invenção é proporcionar um mecanismo pelo qual a classe de um anticorpo anti-IGF-IR pode ser trocada com outra. Em um aspecto da invenção, uma molécula de ácido nucléico codificando VL ou VH é isolada usando métodos de conhecimento geral na técnica de tal modo que não inclua quaisquer seqüências de ácidos nucléicos codificando CL ou CH. As moléculas de ácido nucléico codificando VL ou VH são então ligadas operativamente a uma seqüência de ácidos nucléicos codificando um CL ou CH de uma classe diferente de molécula de imunoglobulina. Isto pode ser feito usando um vetor ou molécula de ácido nucléico que compreende uma cadeia CL ou CH, como descrito acima. Por exemplo, um anticorpo anti-IGF-IR que foi originalmente IgM pode ser trocado de classe para uma IgG. Além disso, a permuta de classe pode ser usada para converter uma subclasse de IgG em outra, por exemplo, de IgG1 para IgG2. Um método preferencial para produzir um anticorpo da invenção compreendendo alguns isótipos desejados compreende as etapas de isolar um ácido nucléico codificando a cadeia pesada de um anticorpo anti-IGF-IR e um ácido nucléico codificando a cadeia leve de um anticorpo anti-IGF-IR, obter a região variável da cadeia pesada, ligar a região variável da cadeia pesada com o domínio constante de uma cadeia pesada do desejado isótipo, expressando a cadeia leve e a cadeia pesada ligada em uma célula, e coletar o anticorpo anti-IGF-IR com o isótipo desejado.

Derivados de Anticorpos.

Pode-se usar as moléculas de ácido nucléico descritas acima para produzir derivados de anticorpos usando técnicas e métodos conhecidos por uma pessoa versada na técnica.

Anticorpos Humanizados

Conforme foi discutido acima em conexão com produção de an-

ticorpos humanos, há vantagens para produzir anticorpos com reduzida imunogenicidade. Isto pode ser feito em algum grau usando técnicas de humanização e técnicas de amostras usando bibliotecas adequadas. Será reconhecido que anticorpos murinos ou anticorpos de outras espécies podem 5 ser humanizados ou primatizados usando técnicas de conhecimento geral na técnica. Ver por exemplo, Winter e Harris *Immunol Today* 14: 43 - 46 (1993) e Wright et al. *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125 - 168 (1992). O anticorpo de interesse pode ser produzido por engenharia genética por meio de técnicas de DNA recombinante substituindo os CH1, CH2, CH3, domínios de eixo, 10 e/ou o domínio de estrutura com a seqüência humana correspondente (ver WO 92/02190 e as Patentes dos Estados Unidos Nos. 5.530.101, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.792, 5.714.350, e 5.777.085). Em uma modalidade preferencial, o anticorpo anti-IGF-IR pode ser humanizado substituindo os CH1, CH2, CH3, domínios de eixo, e/ou o domínio de estrutura com a seqüência 15 humana correspondente ao mesmo tempo que mantendo todos os CDRS da cadeia pesada, da cadeia leve ou tanto das cadeias pesadas quanto leves.

Anticorpos Mutados

Em outra modalidade, as moléculas de ácido nucléico, vetores e células hospedeiras podem ser usadas para preparar anticorpos anti-IGF-IR 20 mutados. Os anticorpos podem ser mutados nos domínios variáveis das cadeias pesadas e/ou leves para alterar uma propriedade de ligação do anticorpo. Por exemplo, pode ser feita uma mutação em uma ou mais das regiões CDR para aumentar ou reduzir o K_d do anticorpo para IGF-IR, para aumentar ou reduzir K_{off} , ou para alterar a especificidade de ligação do anticorpo. Técnicas de mutagênese sítio-dirigida são de conhecimento geral na 25 técnica. Ver, por exemplo, Sambrook et al. e Ausubel et al., *supra*. Em uma modalidade preferencial, são feitas mutações em um resíduo aminoácido que se sabe que é alterado comparado com a germinativa em uma região variável de um anticorpo anti-IGF-IR. Em uma modalidade mais preferencial, 30 uma ou mais mutações são feitas em um aminoácido resíduo que se sabe que é alterado comparado com a linhagem-germinativa em uma região variável ou região CDR de um dos anticorpos anti-IGF-IR 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3,

3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1. Em outra modalidade, uma ou mais mutações são feitas em um resíduo aminoácido que se sabe que é alterado comparado com a linhagem-germinativa em uma região variável ou regiões CDR cuja seqüência de aminoácidos é apresentada na SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 5 14, 16, 18, 20, 22 ou 24, ou àquelas seqüências de ácidos nucléicos é apresentada na SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 ou 23. Em outra modalidade, as moléculas de ácido nucléico são mutadas em uma ou mais das regiões de estrutura. Pode ser feita uma mutação em uma região de estrutura ou domínio constante para aumentar a meia-vida do anticorpo anti- 10 IGF-IR. Ver, por exemplo, WO 00/09560, publicado em 24 de fevereiro de 2000, incorporado a este relatório por meio de referência. Em uma modalidade, pode haver uma, três ou cinco mutações de ponto e não mais de dez mutações de ponto. Também pode ser feita uma mutação em uma região de estrutura ou domínio constante para alterar a imunogenicidade do anticorpo, 15 para proporcionar um sítio para ligação covalente ou não covalente a outra molécula, ou para alterar propriedades tais como fixação do complemento. Podem ser feitas mutações em cada uma das regiões de estrutura, do domínio constante e das regiões variáveis em um único anticorpo mutado. Alternativamente, podem ser feitas mutações em somente uma das regiões de 20 estrutura, das regiões variáveis ou do domínio constante em um único anticorpo mutado.

Em uma modalidade, há não mais de dez alterações de aminoácidos ou nas regiões VH ou VL do anticorpo anti-IGF-IR mutado comparado com o anticorpo anti-IGF-IR antes da mutação. Em uma modalidade mais preferencial, há não mais de cinco alterações de aminoácidos ou nas regiões VH ou VL do anticorpo anti-IGF-IR mutado, mais preferencialmente não mais de três alterações de aminoácidos. Em outra modalidade, há não mais de quinze alterações de aminoácidos nos domínios constantes, mais preferencialmente, não mais de dez alterações de aminoácidos, ainda mais preferencialmente, não mais de cinco alterações de aminoácidos.

Anticorpos Modificados

Em outra modalidade, pode ser preparado um anticorpo de fu-

são ou imunoadesina o qual comprehende todo ou uma porção de um anti-corpo anti-IGF-IR ligado a outro polipeptídeo. Em uma modalidade preferencial, somente as regiões variáveis do anticorpo anti-IGF-IR são ligadas ao polipeptídeo. Em outra modalidade preferencial, o domínio VH de um anti-

5 corpo anti-IGF-IR são ligados a um primeiro polipeptídeo, ao passo que o domínio VL de um anticorpo anti-IGF-IR são ligados a um segundo polipeptídeo que associa com o primeiro polipeptídeo de um modo no qual os domínios VH e VL podem interagir um com o outro para formar um sítio de ligação de anticorpos. Em outra modalidade preferencial, o domínio VH é

10 separado do domínio VL por um ligante de tal modo que os domínios VH e VL podem interagir um com o outro (ver abaixo em Anticorpos de Cadeia Única). O anticorpo VH-ligante-VL é então ligado ao polipeptídeo de interesse. O anticorpo de fusão é útil para orientar um polipeptídeo para uma célula ou tecido expressando IGF-IR. O polipeptídeo pode ser um agente terapêutico, tal como uma toxina, fator de crescimento ou outra proteína regulatória, ou pode ser um agente diagnóstico, tal como uma enzima que pode ser facilmente visualizada, tal como peroxidase de rabano silvestre. Além disso, podem ser criados anticorpos de fusão nos quais dois (ou mais) anticorpos de cadeia única são encadeados a um outro. Isto é útil caso se deseje criar

15 um anticorpo divalente ou polivalente sobre uma única cadeia de polipeptídeo, ou caso se queira criar um anticorpo biespecífico.

20

Para criar um anticorpo de cadeia única, (scFv) os fragmentos de DNA codificando VH e VL são ligados operativamente a outro fragmento codificando um ligante flexível, por exemplo, codificando a seqüência de 25 aminoácidos (Gly₄-Ser)₃ (SEQ ID NO: 60), de tal modo que as seqüências VH e VL podem ser expressas como uma proteína de cadeia única contígua, com as regiões VL e VH ligadas pelo ligante flexível (ver por exemplo, Bird et al. (1988) Science 242: 423 - 426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879 - 5883; McCafferty et al., Nature (1990) 348: 552 - 554). O 30 anticorpo de cadeia única pode ser monovalente, se for usado somente um único VH e VL, bivalente, se forem usados dois VH e VL, ou polivalente, se forem usados mais de dois VH e VL.

Em outra modalidade, outros anticorpos modificados podem ser preparados usando moléculas de ácidos nucléicos codificando anti-IGF-IR. Por exemplo, "Kappa bodies" (III et al., *Protein Eng* 10: 949 - 57 (1997)), "Minibodies" (Martin et al., *EMBO J* 13: 5303 - 9 (1994)), "Diabodies" (Holliger et al., *PNAS USA* 90: 6444 - 6448 (1993)), ou "Janusins" (Traunecker et al., *EMBO J* 10: 3655 - 3659 (1991) e Traunecker et al. "Janusin: new molecular design for bispecific reagents" *Int J Cancer Suppl* 7: 51 - 52 (1992)) podem ser preparados usando técnicas de biologia molecular de rotina seguindo os ensinamentos da especificação.

Em outro aspecto, podem ser produzidos anticorpos quiméricos e biespecíficos. Pode ser preparado um anticorpo quimérico que comprehende CDRs e regiões de estrutura de diferentes anticorpos. Em uma modalidade preferencial, os CDRs do anticorpo quimérico comprehendem todos os CDRs da região variável de uma cadeia leve ou cadeia pesada de um anticorpo anti-IGF-IR, ao passo que regiões de estrutura são derivadas de um ou mais diferentes anticorpos. Em uma modalidade mais preferencial, os CDRs do anticorpo quimérico comprehendem todos os CDRs das regiões variáveis da cadeia leve e da cadeia pesada de um anticorpo anti-IGF-IR. As regiões de estrutura podem ser de outra espécie e pode, em uma modalidade preferencial, ser humanizadas. Alternativamente, as regiões de estrutura podem ser de outro anticorpo humano.

Pode ser produzido um anticorpo biespecífico que liga especificamente a IGF-IR através de um domínio de ligação e a uma segunda molécula através de um segundo domínio de ligação. O anticorpo biespecífico pode ser produzido através de técnicas de biologia molecular recombinante, ou pode ser conjugado junto fisicamente. Além disso, pode ser produzido um anticorpo de cadeia única contendo mais de um VH e VL que liga especificamente a IGF-IR e a outra molécula. Tais anticorpos biespecíficos podem ser produzidos usando técnicas que são de conhecimento geral por exemplo, em conexão com (i) e (ii) ver por exemplo, Fanger et al. *Immunol Methods* 4: 72 - 81 (1994) e Wright e Harris, *supra*, e em conexão com (iii) ver por exemplo, Traunecker et al. *Int. J. Cancer (Suppl.)* 7: 51 - 52 (1992).

Em uma modalidade preferencial, o anticorpo biespecífico liga a IGF-IR e a outra molécula expressa em alto nível em células cancerígenas ou tumorais. Em uma modalidade mais preferencial, a outra molécula é receptor erbB2, VEGF, CD20 ou EGF-R.

- 5 Em uma modalidade, os anticorpos modificados descritos acima
são preparados usando uma ou mais das regiões variáveis ou uma ou mais
regiões CDR de um dos anticorpos selecionados entre 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3,
3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 ou 6.1.1. Em outra modalidade, os anticorpos modifica-
dos são preparados usando uma ou mais das regiões variáveis ou uma ou
10 mais regiões CDR cuja seqüência de aminoácidos é apresentada na SEQ ID
NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 ou 24, ou cuja seqüência de ácidos
nucléicos é apresentada na SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21
ou 23.

Anticorpos Derivados e Marcados

- 15 Um anticorpo ou porção de anticorpo da invenção pode ser deri-
vado ou ligado à outra molécula (por exemplo, outro peptídeo ou proteína).
De modo geral, os anticorpos ou porção dos mesmos são derivados de tal
modo que a ligação de IGF-IR não é afetada de modo adverso pela deriva-
ção ou etiquetação. Por conseguinte, os anticorpos e porções de anticorpos
20 da invenção pretendem incluir tanto formas intactas quanto modificadas dos
anticorpos anti-IGF-IR humanos descritos neste relatório. Por exemplo, um
anticorpo ou porção de anticorpo da invenção pode ser funcionalmente en-
cadeado (por meio de ligação química, fusão genética, associação não co-
valente ou de outro modo) a uma ou mais outras entidades moleculares, tais
25 como outro anticorpo (por exemplo, um anticorpo biespecífico ou um diacor-
po), um agente de detecção, um agente citotóxico, um agente farmacêutico,
e/ou uma proteína ou peptídeo que pode mediar a associação do anticorpo
ou porção de anticorpo com outra molécula (tal como uma região de núcleo
de estreptavidina ou uma etiqueta de poli-histidina).
- 30 Um tipo de anticorpo derivado é produzido por meio de reticula-
ção de dois ou mais anticorpos (do mesmo tipo ou de tipos diferentes, por
exemplo, para criar anticorpos biespecíficos). Reticuladores adequados in-

cluem aqueles que são heterobifuncionais, tendo dois grupamentos distintamente reativos separados por um espaçador adequado (por exemplo, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxissuccinimida) ou homobifuncional (por exemplo, dissuccinimidil suberato). Tais ligantes estão disponíveis na Pierce

5 Chemical Company, Rockford, III,

- Outro tipo de anticorpo derivado é um anticorpo marcado. Agentes de detecção úteis com os quais um anticorpo ou porção de anticorpo da invenção pode ser derivado includem compostos fluorescentes, inclusive fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, 5-dimetilamina-1-naftalenossulfônio cloreto, ficoeritrina, fósforos de lantanídeo e semelhantes.
- 10 Um anticorpo também pode ser marcado com enzimas que são úteis para detecção, tais como peroxidase de râbano silvestre, β -galactosidase, luciferase, fosfatase alcalina, glicose oxidase e semelhantes. Quando um anticorpo é marcado com uma enzima detectável, é detectado acrescentando reagentes adicionais que a enzima usa para produzir um produto da reação que pode ser percebida. Por exemplo, quando está presente o agente peroxidase de râbano silvestre, a adição de peróxido de hidrogênio e diaminobenzeno leva a um produto da reação colorido, o qual é detectável. Um anticorpo também pode ser marcado com biotina, e detectado através de medição indireta da ligação de avidina ou estreptavidina. Um anticorpo pode ser marcado com um agente magnético, tal como gadolínio. Um anticorpo também pode ser marcado com alguns epítopes de polipeptídeos predeterminados reconhecidos por um repórter secundário (por exemplo, seqüências de pares de zíper de leucina, sítios de ligação para anticorpos secundários, domínios de ligação de metal, etiquetas de epítopes). Em algumas modalidades, são fixadas etiquetas por braços espaçadores de várias extensões para reduzir o impedimento estérico potencial.
- 15
- 20
- 25

Um anticorpo anti-IGF-IR também pode ser marcado com um aminoácido radiomarcado. A radioetiqueta pode ser usada tanto para fins diagnósticos quanto terapêuticos. Por exemplo, a radioetiqueta pode ser usada para detectar tumores expressando IGF-IR por meio de radiografia ou outras técnicas diagnósticas. Além disso, a radioetiqueta pode ser usada

terapeuticamente como uma toxina para células cancerosas ou tumores. Exemplos de etiquetas para polipeptídeos incluem, porém sem limitação, os seguintes radioisótopos ou radionuclídeos -- ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I .

5 Um anticorpo anti-IGF-IR também pode ser derivado com um grupo químico tal como polietileno glicol (PEG), um grupo metil ou etil, ou um grupo carboidrato. Estes grupos podem ser úteis para melhorar as características biológicas do anticorpo, por exemplo, para aumentar a meia-vida sérica ou para aumentar a ligação tecidual.

10 Composições Farmacêuticas e Kits

A invenção também refere-se a uma composição farmacêutica para o tratamento de um distúrbio hiperproliferativo em um mamífero o qual compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto da invenção e um veículo farmaceuticamente aceitável. Em uma modalidade, a 15 composição farmacêutica referida é para o tratamento de câncer tal como câncer do cérebro, pulmonar, de células escamosas, da bexiga, gástrico, pancreático, de mama, de cabeça, de pescoço, renal, dos rins, dos ovários, de próstata, colo-retal, do esôfago, ginecológico ou da tireoide. Em outra modalidade, a referida composição farmacêutica refere-se a distúrbios hiperproliferativos não cancerígenos tais como, sem limitação, restenose após angioplastia e psoriase. Em outra modalidade, a invenção refere-se a composições farmacêuticas para o tratamento de um mamífero que requer ativação de IGF-IR, em que a composição farmacêutica compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo ativante da invenção e um veículo 20 farmaceuticamente aceitável. Composições farmacêuticas compreendendo anticorpos ativantes podem ser usadas para tratar animais que carecem de suficiente IGF-I ou IGF-II, ou podem ser usadas para tratar a osteoporose, fraqueza ou distúrbios nos quais o mamífero secreta muito pouco hormônio 25 do crescimento ativo ou é incapaz de responder ao hormônio do crescimento. 30

Os anticorpos anti-IGF-IR da invenção podem ser incorporados em composições farmacêuticas adequadas para administração a um indiví-

duo. Tipicamente, a composição farmacêutica compreende um anticorpo da invenção e um veículo farmaceuticamente aceitável. Conforme usado neste relatório, "veículo farmaceuticamente aceitável" inclui quaisquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e 5 antifúngicos, agentes isotônicos e retardantes da absorção, e semelhantes que são fisiologicamente compatíveis. Exemplos de veículos farmaceuticamente aceitável incluem um ou mais de água, salina, salina tamponada com fosfato, dextrose, glicerol, etanol e semelhantes, bem como combinações dos mesmos. Em muitos casos, será preferencial incluir agentes isotônicos, 10 por exemplo, açúcares, polialcoois tais como manitol, sorbitol, ou cloreto de sódio na composição. Substâncias farmaceuticamente aceitáveis tais como umectantes ou quantidades menores de substâncias auxiliares tais como agentes umectantes ou emulsificantes, conservantes ou tampões, os quais aumentam a estocagem ou eficácia do anticorpo ou porção de anticorpos.

15 As composições desta invenção podem estar em uma variedade de formas. Estas incluem, por exemplo, formas de dosagens líquidas, semi-sólidas e sólidas, tais como soluções líquidas (por exemplo, soluções injetáveis e infundíveis), dispersões ou suspensões, comprimidos, pílulas, pós, lipossomas e supositórios. A forma preferencial depende do modo de administração pretendido e da aplicação terapêutica. Composições típicas preferenciais estão sob a forma de soluções injetáveis ou infundíveis, tais como composições semelhantes às usadas para imunização passiva de seres humanos com outros anticorpos. O modo de administração preferencial é parenteral (por exemplo, intravenosa, subcutânea, intraperitoneal, intramuscular). Em uma modalidade preferencial, o anticorpo é administrado por meio 20 de infusão ou injeção intravenosa. Em outra modalidade preferencial, o anticorpo é administrado por meio de injeção intramuscular ou subcutânea.

25 Composições terapêuticas tipicamente devem ser estéreis e estáveis sob as condições de fabricação e armazenagem. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, dispersão, lipossoma, ou outra estrutura ordenada adequadas para alta concentração de drogas. Soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando o anticorpo

anti-IGF-IR na quantidade requerida em um solvente adequado com um ingrediente ou uma combinação de ingredientes enumerados acima, conforme necessário, seguido por esterilização filtrada. De modo geral, dispersões são preparadas incorporando o composto ativo em um veículo estéril que contém

5 um meio de dispersão básico e os outros ingredientes requeridos entre aqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos de preparação preferenciais são secagem a vácuo e secagem por congelamento que produz um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente desejado adicional de uma solução do

10 mesmo previamente filtrada estéril. A fluidez adequada de uma solução pode ser mantida, por exemplo, por meio do uso de uma camada tal como lecitina, por meio da manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e por meio do uso de tensoativos. A absorção prolongada de composições injetáveis pode ser originada inclusive na composição por um agente

15 que retarda a absorção, por exemplo, sais de monostearato e gelatina.

Os anticorpos da presente invenção podem ser administrados por meio de uma variedade de métodos conhecidos na técnica, embora para muitas aplicações terapêuticas, a via/modo preferencial de administração seja intraperitoneal, subcutânea, intramuscular, intravenosa ou infusão.

20 Conforme será reconhecido pelo técnico versado, a via e/ou modo de administração variarão dependendo dos resultados desejados. Em uma modalidade, os anticorpos da presente invenção podem ser administrados como uma única dose ou podem ser administrados como doses múltiplas.

Em algumas modalidades, o composto ativo pode ser preparado

25 com um veículo que protegerá o composto contra rápida liberação, tal como uma formulação de liberação controlada, inclusive implantes, emplastos transdérmicos, e sistemas de liberação microencapsulados. Podem ser usados polímeros biocompatíveis, biodegradáveis, tais como etileno vinil acetato, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliorthoésteres, e ácido poliláctico. Muitos métodos para a preparação de tais formulações estão patenteados ou são conhecidos de modo geral daqueles versados na técnica. Ver, por exemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.

R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Em algumas modalidades, o anti-IGF-IR da invenção pode ser administrado por via oral, por exemplo, com um diluente inerte ou um veículo comestível assimilável. O composto (e outros ingredientes, se desejado) 5 também pode ser encerrado dentro de uma cápsula de gelatina de concha dura ou mole, prensado em comprimidos, ou incorporado diretamente na dieta do indivíduo. Para administração terapêutica oral, os compostos podem ser incorporados com excipientes e usados sob a forma de comprimidos ingeríveis, comprimidos bucais, trociscos, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, óstias, e semelhantes. Para administrar um composto da invenção 10 por meio de administração diferente da parenteral, pode ser necessário revestir o composto com, ou co-administrar o composto com, um material para evitar sua inativação.

Compostos ativos suplementares também podem ser incorporados nas composições. Em algumas modalidades, um anti-IGF-IR da invenção é co-formulado com e/ou co-administrado com um ou mais agentes terapêuticos adicionais, tais como um agente quimioterápico, um agente anti-neoplásico ou um agente antitumoral. Por exemplo, um anticorpo anti-IGF-IR pode ser co-formulado e/ou co-administrado com um ou mais agentes terapêuticos adicionais. Estes agentes incluem, sem limitação, anticorpos que ligam outros alvos (por exemplo, anticorpos que ligam um ou mais fatores do crescimento ou citocinas, seus receptores da superfície celular ou IGF-I), proteínas de ligação de IGF-I, agentes antineoplásticos, agentes quimioterápicos, agentes antitumorais, oligonucleotídeos anti-sentido contra IGF-IR ou 15 IGF-I, análogos de peptídeos que bloqueiam a ativação de IGF-IR, IGF-IR solúveis, e/ou um ou mais agentes químicos que inibem a produção ou a atividade de IGF-I, os quais são conhecidos na técnica, por exemplo, octreotídeo. Para uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo de 20 ativação, o anticorpo anti-IGF-IR pode ser formulado com um fator que aumenta a proliferação celular ou evita a apoptose. Tais fatores incluem fatores do crescimento tais como IGF-I, e/ou análogos de IGF-I que ativam IGF-IR. Tais terapias combinadas podem exigir menores dosagens do anticorpo anti- 25 30

IGF-IR bem como dos agentes co-administrados, deste modo evitando possíveis toxicidades ou complicações associadas com as várias monoterapias. Em uma modalidade, o anticorpo e um ou mais agentes terapêuticos adicionais.

- 5 As composições farmacêuticas da invenção podem incluir uma "quantidade terapeuticamente eficaz" ou uma "quantidade profilaticamente eficaz" de um anticorpo ou porção de anticorpo da invenção. Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para obter o resultado terapêutico desejado. Uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo ou porção de anticorpo pode variar de acordo com fatores tais como o estado da doença, a idade, o sexo, e o peso do indivíduo, e a capacidade do anticorpo ou porção de anticorpo para provocar uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz é também uma na qual quaisquer 10 efeitos tóxicos ou nocivos do anticorpo ou porção de anticorpo são superados pelos efeitos terapeuticamente benéficos. Uma "quantidade profilaticamente eficaz" refere-se a uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para obter o resultado profilático desejado. Tipicamente, como uma dose profilática é usada nos indivíduos antes de ou em 15 um estágio precoce da doença, a quantidade profilaticamente eficaz será menor do que a quantidade terapeuticamente eficaz.

Os regimes de dosagens podem ser ajustados para proporcionar a resposta ótima desejada (por exemplo, uma resposta terapêutica ou profilática). Por exemplo, um único bolo pode ser administrado, várias doses divididas podem ser administradas durante o tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada como indicado pelas exigências da situação terapêutica. A composição farmacêutica compreendendo o anticorpo ou compreendendo uma combinação de terapias compreendendo o anticorpo e um ou mais agentes terapêuticos adicionais pode ser formulada para 20 doses únicas ou múltiplas. É especialmente vantajoso formular composições parenterais em forma de unidade de dosagem para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. A forma de unidade de dosagem como 25

usada neste relatório refere-se a unidades fisicamente distintas adequadas como dosagens unitárias para os indivíduos mamíferos a serem tratados; cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o veículo farmacêutico necessário. A especificação para as formas de unidade de dosagem da invenção é ditada por e diretamente dependente (a) das características únicas do composto ativo e do efeito particular terapêutico ou profilático a ser atingido, e (b) das limitações inerentes na técnica da combinação de um tal composto ativo para o tratamento da sensibilidade em indivíduos. Uma formulação particularmente útil é 5 mg/ml anticorpo anti-IGF-IR em um tampão de 20 mM de citrato de sódio, pH 5,5, 140 mM de NaCl, e 0,2 mg/ml de polissorbato 80.

Uma faixa típica, não-limitante para uma quantidade terapeuticamente ou profilaticamente eficaz de um anticorpo ou porção de anticorpo da invenção é 0,1 - 100 mg/kg, mais preferencialmente 0,5 - 50 mg/kg, mais preferencialmente 1 - 20 mg/kg, e ainda mais preferencialmente 1 - 10 mg/kg. Deve ser observado que os valores das dosagens podem variar com o tipo e a gravidade da condição a serem aliviados. Deve ser ainda entendido que para qualquer indivíduo em particular, regimes de dosagens específicas devem ser ajustados durante o tempo de acordo com a necessidade do indivíduo e o critério profissional da pessoa que administrar ou supervisionar a administração das composições, e que as faixas de dosagens determinadas neste relatório são somente típicas e não pretendem limitar o âmbito ou a prática da composição reivindicada. Em uma modalidade, a quantidade terapeuticamente ou propilaticamente eficaz de um anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo é administrada junto com um ou mais agentes terapêuticos adicionais.

Em outro aspecto, a invenção refere-se à administração de um anticorpo anti-IGF-IR para o tratamento de câncer em uma dose de menos de 300 mg por mês.

Outro aspecto da presente invenção fornece kits compreendendo os anticorpos anti-IGF-IR e as composições farmacêuticas compreen-

dendo estes anticorpos. Um kit pode incluir, além do anticorpo ou composição farmacêutica, agentes diagnósticos ou terapêuticos. Um kit também pode incluir instruções para uso em um método diagnóstico ou terapêutico.

5 Em uma modalidade preferencial, o kit inclui o anticorpo ou uma composição farmacêutica do mesmo e um agente diagnóstico que pode ser usado em um método descrito abaixo. Em outra modalidade preferencial, o kit inclui o anticorpo ou uma composição farmacêutica do mesmo e um ou mais agentes terapêuticos, tais como um agente antineoplástico, agente antitumoral ou agente quimioterápico adicionais, que podem ser usados em um método

10 descrito abaixo.

Esta invenção também refere-se a composições farmacêuticas para inibir o crescimento celular anormal em um mamífero as quais compreendem uma quantidade de um composto da invenção em combinação com uma quantidade de um agente quimioterápico, em que as quantidades do

15 composto, sal, solvato, ou pró-droga, e do agente quimioterápico são juntas eficazes para inibir o crescimento celular anormal. Muitos agentes quimioterápicos são atualmente conhecidos na técnica. Em uma modalidade, os agentes quimioterápicos são selecionados entre o grupo consistindo em inibidores mitóticos, agentes alquilantes, antimetabólicos, antibióticos intercalantes, inibidores do fator do crescimento, inibidores do ciclo celular, enzimas, inibidores da topoisomerase, agentes anti-sobrevivência, modificadores da resposta biológica, anti-hormônios, por exemplo antiandrógenos, e agentes antiangiogênese.

Agentes antiangiogênese, tais como inibidores de MMP-2 (met-

25 taloproteinase de matriz 2), inibidores de MMP-9 (metaloproteinase de matriz 9), e inibidores de COX-II (ciclooxygenase II), podem ser usados em conjunto com um composto da invenção. Exemplos de inibidores COX-II úteis incluem CELEBREX® (alecoxib), valdecoxib, e rofecoxib. Exemplos de inibidores de metaloproteinase de matriz úteis são descritos em WO 96/33172 (publicado

30 em 24 de outubro de 1996), em WO 96/27583 (publicado em 7 de março de 1996), no Pedido de Patente Européia Nº 97304971.1 (depositado em 8 de julho de 1997), no Pedido de Patente Européia Nº 99308617.2 (depositado

em 29 outubro de 1999), WO 98/07697 (publicado em 26 de fevereiro de 1998), WO 98/03516 (publicado em 29 de janeiro de 1998), WO 98/34918 (publicado em 13 de agosto de 1998), WO 98/34915 (publicado em 13 de agosto de 1998), WO 98/33768 (publicado em 6 de agosto de 1998), WO 5 98/30566 (publicado em 16 de julho de 1998), na Publicação da Patente Européia 606.046 (publicada em 13 de julho de 1994), na Publicação da Patente Européia 931.788 (publicada em 28 de julho de 1999), WO 90/05719 (publicado em 31 de maio de 1990), WO 99/52910 (publicado em 21 de outubro de 1999), WO 99/52889 (publicado em 21 de outubro de 1999), WO 10 99/29667 (publicado em 17 de junho de 1999), no Pedido Internacional PCT Nº PCT/IB98/01113 (depositado em 21 de julho de 1998), no Pedido de Patente Européia Nº 99302232.1 (depositado em 25 de março de 1999), no pedido de patente da Grã Bretanha número 9912961.1 (depositado em 3 de junho de 1999), no Pedido Provisório dos Estados Unidos Nº 60/148.464 15 (depositado em 12 de agosto de 1999), na Patente dos Estados Unidos Nº 5.863.949 (emitida em 26 de janeiro de 1999), na Patente dos Estados Unidos No. 5.861.510 (emitida em 19 de janeiro de 1999), e na Publicação da Patente Européia 780.386 (publicada em 25 de junho de 1997), todos os quais são incorporados a este relatório em sua totalidade por meio de referência. Os inibidores de MMP preferenciais são aqueles que não demonstram artralgia. Mais preferenciais, são aqueles que inibem seletivamente MMP-2 e/ou MMP-9 em relação às outras metaloproteinases de matriz (isto é, MMP-1, MMP-3, MMP-4, MMP-5, MMP-6, MMP-7, MMP-8, MMP-10, MMP-11, MMP-12, e MMP-13). Alguns exemplos específicos de inibidores 20 de MMP úteis na presente invenção são AG-3340, RO 32-3555, RS 13-0830, e os compostos citados na seguinte lista: ácido 3-[[4-(4-flúor-fenóxi)-benzenossulfoni]-1-hidroxicarbamoil-ciclopentil]-amino]-propiônico; hidroxiamida de ácido 3-exo-3-[4-(4-flúor-fenóxi)-benzenossulfonilamino]-8-oxabiciclo[3.2.1]octano-3-carboxílico; hidroxiamida de ácido (2R, 3R) 1-[4-(2-25 cloro-4-flúor-benzilóxi)-benzenossulfonil]-3-hidróxi-3-metil-piperidina-2-carboxílico; hidroxiamida de ácido 4-[4-(4-flúor-fenóxi)-benzenossulfonilamino]-tetrahidro-piran-4-carboxílico; ácido 3-[[4-(4-flúor-30

- fenóxi)-benzenossulfonil]-(1-hidroxicarbamoil-ciclobutil)-amino]-propiônico; hidroxiamida de ácido 4-[4-(4-cloro-fenóxi)-benzenossulfonilamino]-tetraidro-piran-4-carboxílico; hidroxiamida de ácido (R) 3-[4-(4-cloro-fenóxi)-benzenossulfonilamino]-tetraidro-piran-3-carboxílico; hidroxiamida de ácido 5 (2R, 3R) 1-[4-(4-flúor-2-metil-benzilóxi)-benzenossulfonil]-3-hidróxi-3-metil-piperidina-2-carboxílico; ácido 3-[[4-(4-flúor-fenóxi)-benzenossulfonil]-1-hidroxicarbamoil-1-metil-etil]-amino]-propiônico; ácido 3-[[4-(4-flúor-fenóxi)-benzenossulfonil]-4-hidroxicarbamoil-tetraidro-piran-4-il]-amino]-propiônico; hidroxiamida de ácido 3-exo-3-[4-(4-cloro-fenóxi)-benzenossulfonilamino]-8-oxa-ciclo[3.2.1]octano-3-carboxílico; hidroxiamida de ácido 3-endo-3-[4-(4-flúor-fenóxi)-benzenossulfonilamino]-8-oxa-iciclo[3.2.1]octano-3-carboxílico; e hidroxiamida de ácido (R) 3-[4-(4-flúor-fenóxi)-benzenossulfonilamino]-tetraidro-furan-3-carboxílico; e sais e solvatos farmaceuticamente aceitáveis dos referidos compostos.
- 15 Um composto da invenção também pode ser usado com inibidores de transdução de sinal, tais como agentes que podem inibir respostas de EGF-R (receptor de fator do crescimento epidérmico), tais como anticorpos EGF-R, anticorpos EGF, e moléculas que são inibidores de EGF-R; inibidores de VEGF (fator do crescimento endotelial vascular), tais como receptores 20 de VEGF e moléculas que podem inibir VEGF; e inibidores de receptores erbB2, tais como moléculas orgânicas ou anticorpos que ligam ao receptor erbB2, por exemplo, HERCEPTIN® (Genentech, Inc.). Inibidores de EGF-R são descritos, por exemplo em WO 95/19970 (publicado em 27 de julho de 1995), em WO 98/14451 (publicado em 9 de abril de 1998), em WO 25 98/02434 (publicado em 22 de janeiro de 1998), e na Patente dos Estados Unidos No. 5.747.498 (emitida em 5 de maio de 1998), e tais substâncias podem ser usadas na presente invenção como descrito neste relatório. Agentes de inibição de EGFR incluem, porém sem limitação, os anticorpos monoclonais C225 e anti-EGFR 22Mab (ImClone Systems Incorporated), 30 ABX-EGF (Abgenix/Cell Genesys), EMD-7200 (Merck KgaA), EMD-5590 (Merck KgaA), MDX-447/H-477 (Medarex Inc. e Merck KgaA), e os compostos ZD-1834, ZD-1838 e ZD-1839 (AstraZeneca), PKI-166 (Novartis), PKI-

166/CGP-75166 (Novartis), PTK 787 (Novartis), CP 701 (Cephalon), Ieflunomida (Pharmacia/Sugen), CI-1033 (Warner Lambert Parke Davis), CI-1033/PD 183.805 (Warner Lambert Parke Davis), CL-387.785 (Wyeth-Ayerst), BBR-1611 (Boehringer Mannheim GmbH/Roche), Naamidina A (Bristol Myers Squibb), RC-3940-II (Pharmacia), BIBX-1382 (Boehringer Ingelheim), OLX-103 (Merck & Co.), VRCTC-310 (Ventech Research), toxina de fusão de EGF (Seragen Inc.), DAB-389 (Seragen/Ligand), ZM-252808 (Imperial Cancer Research Fund), RG-50864 (INSERM), LFM-A12 (Parker Hughes Cancer Center), WHI-P97 (Parker Hughes Cancer Center), GW-282974 (Glaxo), KT-8391 (Kyowa Hakko) e Vacina de EGF-R (York Medical/Centro de Immunologia Molecular (CIM)). Estes e outros agentes inibidores de EGF-R podem ser usados na presente invenção.

Inibidores de VEGF, por exemplo SU-5416 e SU-6668 (Sugen Inc.), SH-268 (Schering), e NX-1838 (NeXstar) também podem ser combinados com o composto da presente invenção. Inibidores de VEGF são descritos, por exemplo em WO 99/24440 (publicado em 20 de maio de 1999), no Pedido Internacional PCT PCT/IB99/00797 (depositado em 3 de maio de 1999), em WO 95/21613 (publicado em 17 de agosto de 1995), em WO 99/61422 (publicado em 2 de dezembro de 1999), na Patente dos Estados Unidos No. 5.834.504 (emitida em 10 de novembro de 1998), em WO 98/50356 (publicado em 12 de novembro de 1998), na Patente dos Estados Unidos No. 5.883.113 (emitida em 16 de março de 1999), na Patente dos Estados Unidos No. 5.886.020 (emitida em 23 de março de 1999), na Patente dos Estados Unidos No. 5.792.783 (emitida em 11 de agosto de 1998), em WO 99/10349 (publicado em 4 de março de 1999), em WO 97/32856 (publicado em 12 de setembro de 1997), WO 97/22596 (publicado em 26 de junho de 1997), em WO 98/54093 (publicado em 3 de dezembro de 1998), em WO 98/02438 (publicado em 22 de janeiro de 1998), em WO 99/16755 (publicado em 8 de abril de 1999), e em WO 98/02437 (publicado em 22 de janeiro de 1998), todos os quais são incorporados a este relatório em suas totalidades por meio de referência. Outros exemplos de alguns inibidores de VEGF específicos úteis na presente invenção são IM862 (Cytran Inc.); anti-

corpo monoclonal anti-VEGF da Genentech, Inc.; e angiozima, uma ribozima sintética da Ribozyme e Chiron. Estes e outros inibidores de VEGF podem ser usados na presente invenção como descrito neste relatório.

Inibidores de receptor ErbB2, tais como GW-282974 (Glaxo Wellcome plc), e os anticorpos monoclonais AR-209 (Aronex Pharmaceuticals Inc.) e 2B-1 (Chiron), podem além disso ser combinados com o composto da invenção, por exemplo os indicados em WO 98/02434 (publicado em 22 de janeiro de 1998), em WO 99/35146 (publicado em 15 de julho de 1999), em WO 99/35132 (publicado em 15 de julho de 1999), em WO 98/02437 (publicado em 22 de janeiro de 1998), em WO 97/13760 (publicado em 17 de abril de 1997), WO 95/19970 (publicado em 27 de julho de 1995), na Patente dos Estados Unidos No. 5.587.458 (emitida em 24 de dezembro de 1996), e na Patente dos Estados Unidos No. 5.877.305 (emitida em 2 de março de 1999), os quais são todos incorporados por meio deste a este relatório em suas totalidades por meio de referência. Inibidores de receptor ErbB2 úteis na presente invenção também estão descritos no Pedido Provisório dos Estados Unidos No. 60/117.341, depositado em 27 de janeiro de 1999, e o Pedido Provisório dos Estados Unidos No. 60/117.346, depositado em 27 de janeiro de 1999, ambos os quais são incorporados em suas totalidades a este relatório por meio de referência. Os compostos inibidores de receptor erbB2 e substâncias descritas nos pedidos PCT, patentes dos Estados Unidos, e pedidos provisórios dos Estados Unidos supracitados, bem como outros compostos e substâncias que inibem o receptor erbB2, podem ser usados com o composto da presente invenção de acordo com a presente invenção.

Agentes anti-sobrevivência incluem anticorpos anti-IGF-IR e agentes antiintegrina, tais como anticorpos antiintegrina.

Métodos Diagnósticos de Uso

Os anticorpos anti-IGF-IR podem ser usados para detectar IGF-IR em uma amostra biológica *in vitro* ou *in vivo*. os anticorpos anti-IGF-IR podem ser usados em um imunoensaio convencional, inclusive, sem limitação, um ELISA, um RIA, FACS, imuno-histoquímica tecidual, Western blot

ou imunoprecipitação. Os anticorpos anti-IGF-IR da invenção podem ser usados para detectar IGF-IR de seres humanos. Em outra modalidade, os anticorpos anti-IGF-IR podem ser usados para detectar IGF-IR de primatas do Velho Mundo tais como macacos *cinomologous* e *rhesus*, chimpanzés e monos.

5 A invenção fornece um método para detectar anti-IGF-IR em uma amostra biológica compreendendo por uma amostra biológica em contato com um anticorpo anti-IGF-IR da invenção e detectar o anticorpo ligado a anti-IGF-IR, para detectar o IGF-IR na amostra biológica. Em uma modalidade, o anticorpo anti-IGF-IR é diretamente marcado com uma etiqueta detectável.

10 Em outra modalidade, o anticorpo anti-IGF-IR (o primeiro anticorpo) é não-marcado e um segundo anticorpo ou outra molécula que pode ligar o anticorpo anti-IGF-IR é marcado. Conforme é de conhecimento geral daqueles versados na técnica, é escolhido um segundo anticorpo que é capaz de ligar especificamente as espécies específicas e classe do primeiro anticorpo.

15 Por exemplo, se o anticorpo anti-IGF-IR for uma IgG humana, então o anticorpo secundário pode ser uma IgG anti-humana. Outras moléculas que podem ligar a anticorpos incluem, sem limitação, Proteína A e Proteína G, ambas as quais estão disponíveis comercialmente, por exemplo, em Pierce Chemical Co.

20 Etiquetas adequadas para o anticorpo ou anticorpo secundário foram descritas *supra*, e incluem várias enzimas, grupos prostéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes, agentes magnéticos e materiais radioativos. Exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidase de rábano silvestre, fosfatase alcalina, β -galactosidase, ou acetilcolinesterase; exemplos de complexos de grupos prostéticos adequados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem umbeliferon, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloreto de dansila ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente inclui luminol; um exemplo de um agente magnético inclui gadolínio; e exemplos de material radioativo adequados incluem ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S ou ^3H .

Em uma modalidade alternativa, IGF-IR pode ser testado em

uma amostra biológica por meio de um imunoensaio de competição utilizando padrões de IGF-IR marcados com uma substância detectável e um anticorpo anti-IGF-IR não-marcado. Neste teste, a amostra biológica, os padrões de IGF-IR marcados e o anticorpo anti-IGF-IR são combinados e é determinada a quantidade de padrão de IGF-IR marcado ligado ao anticorpo não-marcado. A quantidade de IGF-IR na amostra biológica é inversamente proporcional à quantidade de padrão de IGF-IR marcado ligado ao anticorpo anti-IGF-IR.

Pode-se usar os imunoensaios descritos acima para uma série de finalidades. Em uma modalidade, os anticorpos anti-IGF-IR podem ser usados para detectar IGF-IR em células em cultura celular. Em uma modalidade preferencial, os anticorpos anti-IGF-IR podem ser usados para determinar o nível de fosforilação por tirosina, autofosforilação por tirosina de IGF-IR, e/ou a quantidade de IGF-IR sobre a superfície celular após tratamento das células com vários compostos. Este método pode ser usado para testar compostos que podem ser usados para ativar ou inibir IGF-IR. Neste método, uma amostra de células é tratada com um composto de teste por um período de tempo enquanto outra amostra é deixada sem tratamento. Se for para ser medida a autofosforilação por tirosina, as células são lisadas e a fosforilação por tirosina do IGF-IR é medida usando um imunoensaio descrito acima ou como descrito no Exemplo III, o qual usa um ELISA. Se for para ser medido o nível total de IGF-IR, as células são lisadas e o nível total de IGF-IR é medido usando um dos imunoensaios descritos acima.

Um imunoensaio preferencial para determinar a fosforilação por tirosina de IGF-IR ou para medir os níveis totais de IGF-IR é um ELISA ou Western blot. Se somente for para ser medido o nível de IGF-IR da superfície celular, as células não são lisadas, e os níveis de IGF-IR da superfície celular são medidos usando um dos imunoensaios descritos acima. Um imunoensaio preferencial para determinar os níveis de IGF-IR da superfície celular inclui as etapas de marcar as proteínas da superfície celular com uma etiqueta detectável, tal como biotina ou ^{125}I , imunoprecipitar o IGF-IR com um anticorpo anti-IGF-IR e em seguida detectar o IGF-IR marcado. Ou-

tro imunoensaio preferencial para determinar a localização de IGF-IR, por exemplo, níveis da superfície celular, é usando imuno-histoquímica. Métodos tais como ELISA, RIA, Western blot, imuno-histoquímica, marcação da superfície celular de proteínas da membrana integral e imunoprecipitação são 5 de conhecimento geral na técnica. Ver, por exemplo, Harlow e Lane, *supra*. Além disso, os imunoensaios podem ser graduados para triagem de alta produtividade total de modo a testar um grande número de compostos para ou ativação ou inibição de IGF-IR.

Os anticorpos anti-IGF-IR da invenção também podem ser usados para determinar os níveis de IGF-IR em um tecido ou em células derivadas do tecido. Em uma modalidade preferencial, o tecido é um tecido morto. Em uma modalidade mais preferencial, o tecido é um tumor ou uma biópsia do mesmo. Em uma modalidade preferencial do método, um tecido ou uma biópsia do mesmo é excisado de um paciente. O tecido ou biópsia é então 10 usado em um imunoensaio para determinar, por exemplo, os níveis de IGF-IR, os níveis de IGF-IR da superfície celular, os níveis de fosforilação por tirosina de IGF-IR, ou a localização de IGF-IR por meio dos métodos discutidos acima. O método pode ser usado para determinar se um tumor expressa IGF-IR em um alto nível.

O método diagnóstico descrito acima pode ser usado para determinar se um tumor expressa altos níveis de IGF-IR, o que pode ser indicativo de que o tumor responderá bem ao tratamento com anticorpo anti-IGF-IR. O método diagnóstico também pode ser usado para determinar se um tumor é potencialmente canceroso, se expressa altos níveis de IGF-IR, 15 ou benigno, se expressa baixos níveis de IGF-IR. Além disso, o método diagnóstico também pode ser usado para determinar se o tratamento com anticorpo anti-IGF-IR (ver abaixo) está fazendo com que um tumor expresse menores níveis de IGF-IR e/ou expresse menores níveis de autofosforilação por tirosina, e deste modo pode ser usado para determinar se o tratamento 20 está tendo êxito. De modo geral, um método para determinar se um anticorpo anti-IGF-IR reduz a fosforilação por tirosina compreende as etapas de medir o nível de fosforilação por tirosina em uma célula ou tecido de interes-

se, incubar a célula ou tecido com um anticorpo anti-IGF-IR ou porção de ligação de antígeno do mesmo, em seguida medir novamente o nível de fosforilação por tirosina na célula ou tecido. A fosforilação por tirosina de IGF-IR ou de outra proteína ou proteínas pode ser medida. O método diagnóstico também pode ser usado para determinar se um tecido ou célula não está expressando níveis suficientemente elevados de IGF-IR ou níveis suficientemente elevados de IGF-IR ativado, o que pode ser o caso para indivíduos com nanismo, osteoporose ou diabetes. Um diagnóstico de que os níveis de IGF-IR ou IGF-IR ativo são baixos demais pode ser usado para tratamento com anticorpos ativantes anti-IGF-IR, IGF-I ou outros agentes terapêuticos para aumentar os níveis ou atividade de IGF-IR.

Os anticorpos da presente invenção também podem ser usados *in vivo* para localizar tecidos e órgãos que expressam IGF-IR. Em uma modalidade preferencial, os anticorpos anti-IGF-IR podem ser usados para localizar tumores expressando IGF-IR. A vantagem dos anticorpos anti-IGF-IR da presente invenção é que eles não produzirão uma resposta imune na administração. O método compreende as etapas de administrar um anticorpo anti-IGF-IR ou uma composição farmacêutica do mesmo a um paciente que necessite de um tal teste diagnóstico e submeter o paciente à análise por estudo de imagens para determinar a localização dos tecidos expressando IGF-IR. A análise por estudo por imagens é de conhecimento geral na técnica médica, e inclui, sem limitação, análise radiográficas, estudo por imagens de ressonância magnética (MRI) ou tomografia computadorizada (CE). Em outra modalidade do método, é obtida uma biópsia do paciente para determinar se o tecido de interesse expressa IGF-IR ao invés de submeter o paciente à análise por estudo por imagens. Em uma modalidade preferencial, os anticorpos anti-IGF-IR podem ser marcados com um agente detectável que pode ser estudado por imagens em um paciente. Por exemplo, o anticorpo pode ser marcado com um agente de contraste, tal como bário, o qual pode ser usado para análise radiográfica, ou um agente de contraste magnético, tal como um quelato de gadolínio, o qual pode ser usado para MRI ou CE. Outros agentes de marcação incluem, sem limitação, radioisótopos, tais

como ^{99}Tc . Em outra modalidade, o anticorpo anti-IGF-IR será não-marcado e será estudado por imagens administrando um segundo anticorpo ou outra molécula que seja detectável e que possa ligar o anticorpo anti-IGF-IR.

Métodos Terapêuticos de Uso

5 Em outra modalidade, a invenção fornece um método para inibir a atividade de IGF-IR administrando um anticorpo anti-IGF-IR a um paciente que necessite do mesmo. Quaisquer dos tipos de anticorpos descritos neste relatório podem ser usados terapeuticamente. Em uma modalidade preferencial, o anticorpo anti-IGF-IR é um anticorpo humano, quimérico ou humanizado.
10 Em outra modalidade preferencial, o IGF-IR é humano e o paciente é um paciente humano. Alternativamente, o paciente pode ser um mamífero que expressa um IGF-IR que o anticorpo anti-IGF-IR tem reação cruzada. O anticorpo pode ser administrado a um mamífero não-humano expressando um IGF-IR com o qual o anticorpo tem reação cruzada (isto é, um primata,
15 ou um macaco *cinomologous* ou *rhesus*) para fins veterinários ou como um modelo animal de doença humana. Tais modelos animais podem ser úteis para avaliar a eficácia terapêutica dos anticorpos desta invenção.

Conforme usado neste relatório, o termo "um distúrbio no qual a atividade de IGF-IR é prejudicial" pretende incluir doenças e outros distúrbios nos quais foi demonstrado ou se suspeita de que a presença de altos níveis de IGF-IR em um indivíduo que esteja sofrendo do distúrbio é ou responsável pela patofisiologia do distúrbio ou um fator que contribui para uma piora do distúrbio. Por conseguinte, um distúrbio no qual altos níveis de atividade de IGF-IR são prejudiciais é um distúrbio no qual se espera que a
20 inibição da atividade de IGF-IR alivie os sintomas e/ou a progressão do distúrbio. Tais distúrbios podem ser evidenciados, por exemplo, por um aumento nos níveis de IGF-IR sobre a superfície celular ou em aumento da autofosforilação por tirosina de IGF-IR nas células ou tecidos afetados de um indivíduo que sofre do distúrbio. O aumento nos níveis de IGF-IR pode ser
25 detectado, por exemplo, usando um anticorpo anti-IGF-IR como descrito acima.
30

Em uma modalidade preferencial, um anticorpo anti-IGF-IR pode

ser administrado a um paciente que tenha um tumor expressando IGF-IR. Um tumor pode ser um tumor sólido ou pode ser um tumor não-sólido, tal como um linfoma. Em uma modalidade mais preferencial, um anticorpo anti-IGF-IR pode ser administrado a um paciente que tenha um tumor expressando IGF-IR que seja cancerígeno. Em uma modalidade ainda mais preferencial, o anticorpo anti-IGF-IR é administrado a um paciente que tenha um tumor nos pulmões, de mama, de próstata ou de cólon. Em uma modalidade altamente preferencial, o método faz com que o tumor não aumente de peso ou volume ou reduza de peso ou volume. Em outra modalidade, o método faz com que o IGF-IR sobre o tumor seja internalizado. Em uma modalidade preferencial, o anticorpo é selecionado entre 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, ou 6.1.1, ou compreende uma cadeia pesada, cadeia leve ou região de ligação de antígeno do mesmo.

Em outra modalidade preferencial, um anticorpo anti-IGF-IR pode ser administrado a um paciente que expresse níveis inadequadamente elevados de IGF-I. É de conhecimento na técnica que a expressão em altos níveis de IGF-I pode levar a uma variedade de cânceres comuns. Em uma modalidade mais preferencial, o anticorpo anti-IGF-IR é administrado a um paciente com câncer de próstata, glioma ou fibrossarcoma. Em uma modalidade ainda mais preferencial, o método faz com que o câncer pare de proliferar anormalmente, ou não aumente de peso ou de volume ou reduza de peso ou de volume.

Em uma modalidade, o referido método refere-se ao tratamento de câncer tais como câncer do cérebro, de células escamosas, da bexiga, gástrico, pancreático, de mama, da cabeça, do pescoço, do esôfago, da próstata, colorectal, pulmonar, renal, dos rins, ovariano, ginecológico ou da tireoide. Pacientes que podem ser tratados com alguns compostos da invenção de acordo com os métodos desta invenção incluem, por exemplo, pacientes que foram diagnosticados como tendo câncer pulmonar, câncer ósseo, câncer pancreático, câncer de pele, câncer de cabeça e pescoço, melanoma cutâneo ou intra-ocular, câncer uterino, câncer ovariano, câncer retal, câncer da região anal, câncer do estômago, câncer de cólon, câncer de mama, tu-

mores ginecológicos (por exemplo, sarcomas uterinos, carcinoma das trompas de falópio, carcinoma do endométrio, carcinoma do colo uterino, carcinoma da vagina ou carcinoma da vulva), doença de Hodgkin, câncer do esôfago, câncer do intestino delgado, câncer do sistema endócrino (por exemplo, câncer das glândulas tireoide, paratireoide ou adrenal), sarcomas de tecidos moles, câncer da uretra, câncer do pênis, câncer da próstata, leucemia crônica ou aguda, tumores sólidos da infância, linfomas linfocíticos , câncer da bexiga, câncer do rim ou ureter (por exemplo, carcinoma de células renais, carcinoma da pelve renal), ou neoplasmas do sistema nervoso central (por exemplo, linfoma primário do sistema nervoso central, tumores da coluna vertebral, gliomas do tronco-cerebral ou adenomas da pituitária).

O anticorpo pode ser administrado uma vez, porém mais preferencialmente é administrado múltiplas vezes. O anticorpo pode ser administrado a partir de três vezes ao dia até uma vez a cada seis meses. A administração pode ser em um esquema tal como três vezes ao dia, duas vezes ao dia, uma vez ao dia, uma vez a cada dois dias, uma vez a cada três dias, uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada mês, uma vez a cada dois meses, uma vez a cada três meses e uma vez a cada seis meses. O anticorpo pode ser administrado por via oral, mucosa, bucal, intranasal, inalável, intravenosa, subcutânea, intramuscular, parenteral, intratumoral ou tópica. O anticorpo pode ser administrado em um sítio distante do sítio do tumor. O anticorpo também pode ser administrado continuamente através de um miniêmbolo. O anticorpo pode ser administrado uma vez, no mínimo duas vezes ou por no mínimo o período de tempo até a condição ser tratada, aliviada ou curada. O anticorpo geralmente será administrado por tanto tempo quanto o tumor estiver presente contanto que o anticorpo faça com que o tumor ou câncer pare de crescer ou reduza de peso ou de volume. O anticorpo geralmente será administrado como parte de uma composição farmacêutica como descrito acima. A dosagem do anticorpo geralmente estará dentro da faixa de 0,1 - 100 mg/kg, mais preferencialmente 0,5 - 50 mg/kg, mais preferencialmente 1 - 20 mg/kg, e ainda mais preferencialmente 1 - 10 mg/kg. A concentração sérica do anticorpo pode ser medida por meio

de qualquer método conhecido na técnica. Ver, por exemplo, o Exemplo XVII abaixo. O anticorpo também pode ser administrado profilaticamente de modo a evitar que ocorra um câncer ou tumor. Isto pode ser especialmente útil em pacientes que tenham um nível "normal alto" de IGF-I porque foi demonstrado que estes pacientes têm um maior risco de desenvolver cânceres comuns. Ver Rosen et al., *supra*.

Em outro aspecto, o anticorpo anti-IGF-IR pode ser co-administrado com outros agentes terapêuticos, tais como drogas ou moléculas antineoplásicas, a um paciente que tenha um distúrbio hiperproliferativo, tal como câncer ou um tumor. Em um aspecto, a invenção refere-se a um método para o tratamento do distúrbio hiperproliferativo em um mamífero compreendendo administrar ao referido mamífero uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto da invenção em combinação com um agente antitumoral selecionado entre o grupo consistindo em, porém sem limitação, inibidores mitóticos, agentes alquilantes, antimetabólicos, agentes intercalantes, inibidores do fator do crescimento, inibidores do ciclo celular, enzimas, inibidores de topoisomerase, modificadores da resposta biológica, anti-hormônios, inibidores de cinase, inibidores de metaloprotease de matriz, agentes terapêuticos genéticos e antiandrógenos. Em uma modalidade mais preferencial, o anticorpo pode ser administrado com um agente antineoplásico, tal como adriamicina ou taxol. Em outra modalidade preferencial, o anticorpo ou combinação de terapias é administrado junto com radioterapia, quimioterapia, terapia fotodinâmica, cirurgia ou outras imunoterapias. Em ainda outra modalidade preferencial, o anticorpo será administrado com outro anticorpo. Por exemplo, o anticorpo anti-IGF-IR pode ser administrado com um anticorpo ou outro agente que se sabe que inibe a proliferação de tumores ou de células cancerígenas, por exemplo, um anticorpo ou agente que inibe o receptor de erbB2, EGF-R, CD20 ou VEGF.

A co-administração do anticorpo com um agente terapêutico adicional (combinação de terapias) engloba administrar uma composição farmacêutica compreendendo o anticorpo anti-IGF-IR e o agente terapêutico adicional e administrar duas ou mais composições farmacêuticas isoladas,

uma compreendendo o anticorpo anti-IGF-IR e a outra ou outras compreendendo o agente ou agentes terapêuticos adicionais. Além disso, embora a co-administração ou combinação de terapias geralmente signifique que o anticorpo e agentes terapêuticos adicionais são administrados ao mesmo tempo que o outro, também engloba casos nos quais o anticorpo e agentes terapêuticos adicionais são administrado em momentos diferentes. Por exemplo, o anticorpo pode ser administrado uma vez a cada três dias, enquanto o agente terapêutico adicional é administrado uma vez ao dia. Alternativamente, o anticorpo pode ser administrado antes ao ou em seguida ao tratamento do distúrbio com agente terapêutico adicional. Do mesmo modo, a administração do anticorpo anti-IGF-IR pode ser administrada antes a ou em seguida à outra terapia, tal como radioterapia, quimioterapia, terapia fotodinâmica, cirurgia ou outra imunoterapia.

O anticorpo e um ou mais agentes terapêuticos adicionais (a combinação de terapias) podem ser administrados uma vez, duas vezes ou no mínimo o período de tempo até a condição ser tratada, aliviada ou curada. Preferencialmente, a combinação de terapias é administrada múltiplas vezes. A combinação de terapias pode ser administrada a partir de três vezes ao dia até uma vez a cada seis meses. A administração pode ser em um esquema tal como três vezes ao dia, duas vezes ao dia, uma vez ao dia, uma vez a cada dois dias, uma vez a cada três dias, uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada mês, uma vez a cada dois meses, uma vez a cada três meses e uma vez a cada seis meses, ou pode ser administrada continuamente através de um miniêmbolo. A combinação de terapias pode ser administrada através de via oral, mucosa, bucal, intranasal, inalável, intravenosa, subcutânea, intramuscular, parenteral, intratumoral ou tópica. A combinação de terapias pode ser administrada em um sítio distante do sítio do tumor. A combinação de terapias geralmente será administrada por tanto tempo quanto o tumor estiver presente contanto que o anticorpo faça com que tumor ou câncer pare de crescer ou reduza de peso ou de volume.

Em ainda uma modalidade adicional, o anticorpo anti-IGF-IR é

marcado com uma radioetiqueta, uma imunotoxina ou uma toxina, ou é uma proteína de fusão compreendendo um peptídeo tóxico. O anticorpo anti-IGF-IR ou proteína de fusão de anticorpo anti-IGF-IR orienta a radioetiqueta, imunotoxina, toxina ou peptídeo tóxico para o tumor expressando IGF-IR ou 5 célula cancerígena. Em uma modalidade preferencial, a radioetiqueta, imunotoxina, toxina ou peptídeo tóxico é internalizado após o anticorpo anti-IGF-IR ligar ao IGF-IR sobre a superfície do tumor ou célula cancerígena.

Em outro aspecto, o anticorpo anti-IGF-IR pode ser usado terapeuticamente para induzir a apoptose de células específicas em um paciente 10 que necessite do mesmo. Em muitos casos, as células visadas para apoptose são células cancerígenas ou tumorais. Portanto, em uma modalidade preferencial, a invenção fornece um método para induzir apoptose administrando uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-IGF-IR a um paciente que necessite do mesmo. Em uma modalidade preferencial, o 15 anticorpo é selecionado entre 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, ou 6.1.1, ou compreende uma cadeia pesada, cadeia leve ou região de ligação de antígeno do mesmo.

Em outro aspecto, o anticorpo anti-IGF-IR pode ser usado para tratar estados não-cancerígenos nos quais altos níveis de IGF-I e/ou IGF-IR 20 foram associados com o estado ou doença não-cancerígena. Em uma modalidade, o método compreende a etapa de administrar um anticorpo anti-IGF-IR a um paciente que tenha um estado patológico não-cancerígeno causado ou exacerbado por altos níveis de IGF-I e/ou níveis ou atividade de IGF-IR. Em uma modalidade preferencial, o estado patológico não- 25 cancerígeno é acromegalia, gigantismo, psoríase, aterosclerose, restenose à musculatura lisa dos vasos sanguíneos ou proliferação microvascular inadequada, tal como a encontrada como uma complicação dos diabetes, especialmente dos olhos. Em uma modalidade mais preferencial, o anticorpo anti-IGF-IR retarda o progresso do estado patológico não-cancerígeno. Em uma 30 modalidade mais preferencial, o anticorpo anti-IGF-IR para ou reverte, no mínimo em parte, o estado patológico não-cancerígeno.

Em outro aspecto, a invenção fornece um método para adminis-

trar um anticorpo anti-IGF-IR ativante a um paciente que necessite do mesmo. Em uma modalidade, o anticorpo ativante ou composição farmacêutica é administrado a um paciente que necessite do mesmo em uma quantidade eficaz para aumentar a atividade de IGF-IR. Em uma modalidade mais preferencial, o anticorpo ativante é capaz de restaurar a atividade normal de IGF-IR. Em outra modalidade preferencial, o anticorpo ativante pode ser administrado a um paciente que tenha baixa estatura, neuropatia, uma redução na massa muscular ou osteoporose. Em outra modalidade preferencial, o anticorpo ativante pode ser administrado com um ou mais outros fatores que aumentam a proliferação celular, evitam apoptose ou aumentam a atividade de IGF-IR. Tais fatores incluem fatores do crescimento tais como IGF-I, e/ou análogos de IGF-I que ativam IGF-IR. Em uma modalidade preferencial, o anticorpo é selecionado entre 4.17.3, ou compreende uma cadeia pesada, cadeia leve ou porção de ligação de antígeno do mesmo.

15 Terapia Genética

As moléculas de ácido nucléico da presente invenção podem ser administradas a um paciente que necessite do mesmo via terapia genética. A terapia pode ser ou *in vivo* ou *ex vivo*. Em uma modalidade preferencial, moléculas de ácidos nucléicos codificando tanto uma cadeia pesada quanto uma cadeia leve são administradas a um paciente. Em uma modalidade mais preferencial, as moléculas de ácido nucléico são administradas de tal modo que elas sejam estavelmente integradas no cromossomo de células B porque estas células são especializadas para produzir anticorpos. Em uma modalidade preferencial, precursores de células B são transfectados ou infectados *ex vivo* e retransplantados em um paciente que necessite dos mesmos. Em outra modalidade, precursores de células B ou outras células são infectados *in vivo* usando um vírus que se sabe que infecta o tipo celular de interesse. Vetores típicos usados para terapia genética incluem lipossomas, plasmídeos, ou vetores virais, tais como retrovírus, adenovírus e vírus adeno-associados. Após infecção ou *in vivo* ou *ex vivo*, os níveis da expressão de anticorpos podem ser monitorados tomando uma amostra do paciente tratado e usando qualquer imunoensaio conhecido na técnica e discuti-

do neste relatório.

Em uma modalidade preferencial, o método de terapia genética compreende as etapas de administrar uma quantidade eficaz de uma molécula de ácido nucléico isolada codificando a cadeia pesada ou a porção de ligação de antígeno da mesma do anticorpo humano ou porção do mesmo e expressando a molécula de ácido nucléico. Em outra modalidade, o método de terapia genética compreende as etapas de administrar uma quantidade eficaz de uma molécula de ácido nucléico isolada codificando a cadeia leve ou a porção de ligação de antígeno da mesma do anticorpo humano ou porção do mesmo e expressando a molécula de ácido nucléico. Em um método mais preferencial, o método de terapia genética compreende as etapas de administrar uma quantidade eficaz de uma molécula de ácido nucléico isolada codificando a cadeia pesada ou a porção de ligação de antígeno da mesma do anticorpo humano ou porção do mesmo e uma quantidade eficaz de uma molécula de ácido nucléico isolada codificando a cadeia leve ou a porção de ligação de antígeno da mesma do anticorpo humano ou porção do mesmo e expressando as moléculas de ácido nucléico. O método de terapia genética também pode compreender a etapa de administrar outro agente anticancerígeno, tal como taxol, tamoxifeno, 5-FU, adriamicina ou CP-358.774.

De modo que esta invenção possa ser melhor entendida, são estabelecidos os seguintes exemplos. Estes exemplos são para fins de ilustração somente e não devem ser considerados de modo algum como limitantes para o âmbito da invenção.

25 **EXEMPLO I: Produção de Hibridomas Produtores de Anticorpos Anti-IGF-IR**

Os anticorpos da invenção foram preparados, selecionados, e testados como se segue:

Imunização e produção de hibridoma

XENOMICE[®] de oito a dez semanas de idade foi imunizado por via intraperitoneal ou em suas patas traseiras com ou o domínio extracelular de IGF-IR humano (10 µg/dose/camundongo), ou com células 3T3-IGF-IR ou 300.19-IGF-IR, as quais são duas linhagens celulares transfetadas que ex-

pressam IGF-IR humano em suas membranas plasmáticas (10×10^6 células/dose/camundongo). Esta dose foi repetida cinco a sete vezes por um período de três a oito semanas. Quatro dias antes da fusão, os camundongos receberam uma injeção final do domínio extracelular de IGF-IR humano em PBS. Linfócitos do baço e de linfonodos de camundongos imunizados foram fundidos com a linhagem celular de mieloma não-secretor P3-X63-Ag8.653 e foram submetidos à seleção HAT como previamente descrito (Galfre e Milstein, *Methods Enzymol.* 73: 3 - 46, 1981). Um painel de hibridomas todos secretando anticorpos IgG2x humanos IGF-IR específicos foi recuperado. Sete hibridomas produtores de anticorpos monoclonais específicos para IGF-IR foram selecionados para estudo posterior e foram designados 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2, 4.17.3 e 6.1.1.

Os hibridomas 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, 3.1.1, 4.9.2 e 4.17.3 foram depositados na American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, em 12 de dezembro de 2000 com os seguintes números de depósito:

	<u>Hibridoma</u>	<u>Depósito No.</u>
	2.12.1	PTA-2792
	2.13.2	PTA-2788
20	2.14.3	PTA-2790
	3.1.1	PTA-2791
	4.9.2	PTA-2789
	4.17.3	PTA-2793

EXEMPLO II: Determinação de Constantes de Afinidade (K_d) de Anticorpos Monoclonais Anti-IGF-IR Totalmente Humanos por BIACore

Foram feitas medidas de afinidade de anticorpos purificados por ressonância de plásmon superficial usando o instrumento BIACore 3000, seguindo os protocolos do fabricante.

Protocolo 1

30 Para realizar análise cinética, proteína A foi imobilizada sobre as superfícies do sensorchip do BIACore. O sensorchip foi então usado para capturar os anticorpos anti-IGF-IR da presente invenção. Diferentes concen-

trações do domínio extracelular de IGF-IR foram injetadas sobre o sensorchip e as cinéticas de ligação e de dissociação das interações entre os anticorpos anti-IGF-IR e o domínio extracelular de IGF-IR foram analisadas. Os dados foram avaliados com ajuste global Langmuir 1 : 1, usando modelos de

- 5 mudança basais disponíveis no programa BIAevaluation fornecido pelo BIAcore.

Protocolo 2

- Foram realizadas medições de BIACore essencialmente como descrito por Fagerstam et al. "Detection of antigen-antibody interactions by 10 surface plasmon resonance. Applications to epitope mapping." J. Mol. Recog. 3: 208 - 214. (1990).

A Tabela I lista medições por afinidade para anticorpos anti-IGF-IR típicos da presente invenção:

Tabela I

Anticorpo Monoclonal	K _d (M) Protocolo 1	K _d (M) Protocolo 2
2.12.1	7,37 x 10 ⁻⁹	
2.13.2	3,5 x 10 ⁻⁹	1,53 x 10 ⁻⁹
2.14.3	6,41 x 10 ⁻¹⁰	
3.1.1	1,15 x 10 ⁻⁹	
4.9.2	6,84 x 10 ⁻¹⁰	4,27 x 10 ⁻¹⁰
4.17.3	1,3 x 10 ⁻⁸	
6.1.1	5,65 x 10 ⁻¹⁰	

- 15 A análise cinética indica que os anticorpos preparados de acordo com a invenção possuem altas afinidades e fortes constantes de ligação para o domínio extracelular de IGF-IR.

EXEMPLO III: Inibição mediada por Anticorpo da Fosforilação de IGF-I induzida por IGF-IR

- 20 Foram feitos experimentos de ELISA de modo a determinar se os anticorpos desta invenção eram capazes de bloquear a ativação de IGF-IR mediada por IGF-IR. A ativação de IGF-IR mediada por IGF-I foi detectada por meio de aumento da fosforilação por tirosina associada a receptor.

Preparação de Lâmina ELISA

Foram preparadas lâminas de captura ELISA adicionando 100 µl de tampão de bloqueio (3 % de albumina sérica bovina [BSA] em solução salina tamponada com Tris [TBS]) a cada cavidade de algumas lâminas de

- 5 96 cavidades revestidas com Proteína G ReactiBind (Pierce) e foram incubadas as lâminas com agitação por 30 minutos à temperatura ambiente. Foi diluído anticorpo anti-IGF-IR pan-específico SC-713 de coelho (Santa Cruz) em tampão de bloqueio a uma concentração de 5 µg/ml e foram adicionados 100 µl de anticorpo diluído a cada cavidade. Foram incubadas as lâminas
- 10 com agitação por 60 - 90 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foram lavadas as lâminas cinco vezes com tampão de lavagem (TBS + 0,1 % Tween 20) e suavemente borrado o tampão remanescente sobre papel absorvente. Estas lâminas não foram deixadas para secar antes da adição de lisado.

- 15 15 Preparação de Lisado de Células expressando IGF-IR

- Foram colocadas células NIH-3T3 transfetadas com IGF-IR (5×10^4 /ml) em 100 µl de meios de crescimento (meios de alto teor de glicose DMEM suplementados com L-glutamina (0,29 mg/ml), 10 % de FBS inativado por calor, e 500 µg/ml cada geneticina, penicilina e estreptomicina) em 20 lâminas de fundo em U de 96 cavidades. Foram incubadas as lâminas a 37°C, 5 % de CO₂ de um dia para o outro para deixar as células fixarem. Foram decantados os meios das lâminas e os substituímos com 100 µl de meios de crescimento fresco por cavidade. Para a experimentação, foram diluídos os anticorpos anti-IGF-IR potenciais para cinco vezes a concentração final desejada em meios de crescimento e forma adicionados 25 µl por cavidade. Todas as amostras foram feitas em triplicata. Em seguida foram incubadas as lâminas a 37°C por uma hora. Foram estimuladas as células com 25 µl/cavidade de 600 ng/ml de IGF-1 (preparado em meios de crescimento) e incubadas e as lâminas à temperatura ambiente por 10 minutos.
- 25 30 Em seguida foram decantados os meios invertendo as lâminas e borrando suavemente sobre papel absorvente e foram lisados as células aderentes adicionando 50 µl de tampão de lise (50 mM de HEPES, pH 7,4, 10 mM de

EDTA, 150 mM de NaCl, 1,5 mM de MgCl₂, 1,6 mM de NaVO₄, 1 % de Triton X-100, 1 % de glicerol suplementado imediatamente antes do uso com um comprimido de inibidor de protease livre de EDTA [Roche Molecular Sciences] por 50 ml) e agitando por 5 minutos à temperatura ambiente. Foram

- 5 adicionados 200 µl de tampão de diluição (50 mM de HEPES, pH 7,4, 1,6 mM de NaVO₄) a cada cavidade e misturadas pipetando para cima e para baixo. Foram transferidos 100 µl do lisado de cada cavidade para cada cavidade da lâmina de captura ELISA preparada como descrito acima e incubada com suave agitação por duas horas à temperatura ambiente.

● 10 ELISA com Anticorpos Antitirosina-fosfato (pTYR)

Foi removido o lisado celular invertendo as lâminas, foram lavadas as lâminas cinco vezes com tampão de lavagem e borradas sobre papel absorvente. Foram adicionados 100 µl por cavidade de anticorpo pTYR-específico (HRP-PY54) diluído em tampão de bloqueio a uma concentração de 0,2 µg/ml e foram incubadas as lâminas com agitação por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foram lavadas estas lâminas cinco vezes com tampão de lavagem e borrou-se sobre papel absorvente.

Foi detectada a ligação do anticorpo HRP-PY54 adicionando 100 µl por cavidade de solução de substrato de peroxidase TMB (Kirkegaard & Perry) e incubando com agitação à medida que desenvolvia cor (cerca de 2 - 10 minutos). Foi interrompida a reação de desenvolvimento de cor adicionando 100 µl por cavidade de solução de interrupção TMB (Kirkegaard & Perry). Em seguida, as lâminas foram agitadas por 10 segundos à temperatura ambiente para misturar a solução e quantificadas por meio de medição 25 a OD_{450nm}.

A Tabela II e a Figura 4 mostram os resultados deste experimento realizado com vários anticorpos da invenção. Os resultados deste experimento demonstram a capacidade dos anticorpos desta invenção para bloquear a ativação de IGF-IR mediada por IGF-I como demonstrado por 30 aumento da fosforilação por tirosina associada com receptor. Além disso, estes resultados podem ser usados para quantificar a potência relativa dos anticorpos desta invenção.

Tabela II

Anticorpo Monoclonal	IC ₅₀ (μg/ml)
2.12.1	0,172
2.13.2	0,0812
2.14.3	0,325
4.9.2	0,0324

EXEMPLO IV: Bloqueio mediado por Anticorpo da Ligação IGF-I/IGF-IR

Foram feitos experimentos ELISA para quantificar a capacidade dos anticorpos da invenção para inibir a ligação de IGF-I a IGF-IR em um teste celular. Foram laminadas células NIH-3T3 transfetadas com IGF-IR (5×10^4 /ml) em 100 μl de meios de alto teor de glicose DMEM suplementados com L-glutamina (0,29 mg/ml), 10 % de FBS inativado por calor, e 500 μg/ml cada de geneticina, penicilina e estreptomicina em lâminas de fundo em U de 96 cavidades. Em seguida foram incubadas as lâminas a 37°C, 5 % CO₂ de um dia para o outro para permitir que as células fixassem. Em seguida foram decantados os meios das lâminas e substituídos com 100 μl de meios frescos por cavidade. Para a experimentação, foram diluídos anticorpos em meios de teste (meios de alto teor de glicose DMEM suplementados com L-glutamina, 10 % de FBS inativado por calor, 200 μg/ml de BSA e 500 μg/ml cada de geneticina, penicilina e estreptomicina) para a concentração final desejada e adicionou-se 50 μl por cavidade. Todas as amostras foram feitas em triplicata. Em seguida incubou-se as lâminas a 37°C por dez minutos. Diluiu-se [¹²⁵I]-IGF-I a uma concentração de 1 μCi/ml em meios de teste e foram adicionados 50 μl por cavidade da lâmina. Como um controle para radioatividade de fundo, adicionou-se IGF-I frio a uma concentração final de 100 ng/ml. As lâminas foram incubadas por 10 minutos a 37°C, os meios foram decantados espalhando suavemente sobre papel absorvente e lavou-se duas vezes com meios de teste. Em seguida, lisaram-se as células adicionando 50 μl de NaOH a 0,1 N, 0,1 % de SDS e centrifugando as lâminas por cinco minutos à temperatura ambiente. Então, as amostras foram transferidas para uma lâmina de cintilação, 150 μl de Supermix OptiPhase foram

adicionados e o sinal foi lido em um contador Wallac Micro-Beta.

A Tabela III e a Figura 3 mostram os resultados deste experimento feito com três anticorpos típicos da invenção. Este experimento demonstrou que os anticorpos da invenção especificamente inibem a ligação de [¹²⁵I]-IGF-I a células superexpressando IGF-IR.

Tabela III

Anticorpo Monoclonal	IC ₅₀
2.12.1	0,45 µg/ml
2.13.2	0,18 µg/ml
4.9.2	0,1 µg/ml

EXEMPLO V: Estudos de Mapeamento de Epitopos

Tendo demonstrado que os anticorpos da invenção reconhecem IGF-IR, foram realizados estudos de mapeamento de epitopos com vários 10 anticorpos da invenção. Estes experimentos foram focalizados particularmente sobre os anticorpos 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, e 4.9.2.

Estudos de competição BIACore foram conduzidos para determinar se os anticorpos desta invenção ligam ao mesmo ou a sítios distintos sobre a molécula de IGF-IR. Ligou-se o domínio extracelular (ECD) de IGF-15 IR para um sensorchip BIACore como descrito acima no Exemplo II. Ligou-se um primeiro anticorpo da invenção a este IGF-IR ligado a sensorchip sob condições de saturação. Em seguida, mediu-se a capacidade dos anticorpos secundários subseqüentes da invenção para competir com o anticorpo primário para ligação a IGF-IR. Esta técnica permitiu atribuir os anticorpos 20 desta invenção a diferentes grupos de ligação.

Este experimento foi realizado com os anticorpos 2.12.1, 2.13.2, 2.14.3, e 4.9.2. Observou-se que 2.13.2 e 4.9.2 competem para o mesmo sítio sobre o domínio extracelular de IGF-IR. Os outros anticorpos, 2.12.1 e 2.14.3, ligam-se a sítios sobre IGF-IR que são diferentes tanto uns dos outros quanto do sítio ligado por 2.13.2 e 4.9.2.

EXEMPLO VI: Espécie de Reatividade Cruzada dos Anticorpos da Invenção

De modo a determinar a espécie de reatividade cruzada dos anticorpos da invenção, foram realizados diversos experimentos inclusive

imunoprecipitação, bloqueio mediado por anticorpos de fosforilação de receptor induzida por IGF-I e análise FACS.

Para realizar experimentos de imunoprecipitação, as células foram laminadas em meios de alto teor de glicose DMEM suplementados com 5 L-glutamina (0,29 mg/ml), 10 % de FBS inativado por calor, e 500 µg/ml cada de geneticina, penicilina e estreptomicina para 50 % de confluência em frascos T25. Em seguida, foram adicionados 100 µl de um anticorpo da invenção em solução salina tamponada de Hank (HBSS; Gibco BRL) em uma concentração de 1 µg/ml. As lâminas foram incubadas por 30 minutos a 10 37°C em uma incubadora e, em seguida, as células foram estimuladas com IGF-I a 100 ng/ml por 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram lisadas em tampão RIPA (Harlow e Lane, acima) e IGF-IR imunoprecipitado com 2 µg de anticorpo anti-IGF-IR pan-específico SC-713 (Santa Cruz) mais contas de agarose com proteína A por 1 hora a 4°C. As contas foram peletizadas e lavadas três vezes com PBS/T (PBS + 0,1 % Tween-20) e em seguida, as contas foram fervidas em 40 µl de tampão Laemmli contendo 5 % de MME.

As amostras preparadas como descrito acima foram em seguida analisadas por Western blot. Foram carregados 12 µl de cada amostra por 20 alameda sobre géis Novex® a 4 - 10 % de gradiente passado com tampão 1X MES (Novex®). Os géis foram passados a 150 V por 1 hora ou a 200 V por cerca de 30 minutos. Em seguida transferiu-se o gel para uma membrana em tampão de transferência Novex® com 10 % de metanol ou de um dia para o outro a 100 mA ou por 1 - 1,5 hora a 250 mA. Em seguida, a membrana foi deixada secar completamente e bloqueada à temperatura ambiente com TBS (solução salina tamponada com Tris, pH 8,0) contendo Superblock (Pierce Chemical Co.). Adicionou-se o anticorpo de borrão de IGF-IR SC713 (Santa Cruz) para detectar IGF-IR imunoprecipitado.

Este experimento foi realizado com anticorpos da invenção, particularmente 2.12.1, 2.13.2, 4.17.3 e 4.9.2, sobre células de uma variedade de animais. Foi descoberto que os anticorpos 2.12.1, 2.13.2 e 4.9.2 foram capazes de ligar IGF-IR humano, mas não canino, de porquinho-da-Índia, ou

de coelho. Além disso, estes anticorpos foram capazes de ligar IGF-IR de *Rhesus* e COS7, ambos derivados de macacos do velho mundo, mas não IGF-IR de sagüí ("marmoset"), o qual é um macaco do novo mundo. Estes experimentos indicam que os anticorpos são altamente específicos.

5 Bloqueio mediado por Anticorpos da Ligação

IGF-I/IGF-IR em Primatas Não-humanos

Após a observação de que os anticorpos da invenção reconhecem IGF-IR de macacos do velho mundo, também testou-se sua capacidade para bloquear a ligação IGF-I/IGF-IR em células derivadas destes macacos
10 do velho mundo. Células foram laminadas em meios de alto teor de glicose DMEM suplementados com L-glutamina, 10 % de FBS inativado por calor, e 500 µg/ml cada de genenticina, penicilina e estreptomicina para 50 % confluência em frascos T25. Em seguida, adicionou-se um anticorpo da invenção, ou meios sem anticorpo como um controle, e as células foram estimuladas
15 com IGF-I a 100 ng/ml por 10 minutos à temperatura ambiente. Após estimulação, as células foram lisadas e IGF-IR imunoprecipitado com anticorpo pan-específico para IGF-IR SC713 como descrito acima. Em seguida, realizou-se análise Western blot como descrito acima usando anticorpo HRP-PY54 para detectar tirosina fosforilada no IGF-IR ativado.

20 Observou-se que os anticorpos desta invenção, em particular, 2.13.2 e 4.9.2 podem bloquear a fosforilação induzida por IGF-I de IGF-IR tanto em células COS7 quanto de *Rhesus*. A IC₅₀ para a inibição observada foi de 0,02 µg/ml e 0,005 µg/ml para IGF-IR de COS7 e *Rhesus*, respectivamente.

25 Determinação da Afinidade Cruzada entre Espécies dos Anticorpos da Invenção

Realizou-se análise FACS para determinar a afinidade dos anticorpos da invenção para IGF-IR de outros animais, particularmente os macacos do velho mundo descritos acima. Alíquotas de células humanas e de
30 macaco foram incubadas (5×10^5) por 1 hora sobre gelo com concentrações crescentes de anticorpos anti-IGF-IR biotinilados da invenção ou com um anticorpo de hemocianina lampreia de anti-*Fissurella* biotinilada (KLH)

(Abgenix) como um controle negativo. Em seguida, as amostras foram incubadas por 30 minutos sobre gelo com RPE conjugado à esteptavidina (ficoeritrina). A ligação foi medida por meio de citometria de fluxo e foram analisados os histogramas de intensidade de fluorescência (F12-H) versus o número de células (Contagens) usando o programa CellQuest. Calculou-se a ligação (K_d) para cada anticorpo a partir de gráficos da intensidade de fluorescência média versus a concentração de anticorpos. Na maioria dos experimentos, mediu-se a ligação em células MCF-7 humanas cultivadas e ou células de cultura de tecido de *rhesus* ou *cinomologous*. Controlou-se para depleção do anticorpo medindo a ligação por uma série de concentrações celulares.

Realizaou-se a análise FACS supracitada para testar a capacidade dos anticorpos da invenção, particularmente 2.13.2 e 4.9.2, para ligar células humanas, de *rhesus* e de *cinomologous*. Observou uma ligação meia máxima (K_d) de 0,1 µg/ml para todas as linhagens de células testadas,

EXEMPLO VII: Baixa regulação de Receptor de IGF-I

Foram realizados experimentos de bloqueio essencialmente como descrito acima no Exemplo IV até a adição de [125 I]-marcada IGF-I. Neste ponto, as células foram fervidas em 40 µl de tampão Laemmli contendo 50 % de me. Em seguida, as amostras foram analisadas por análise western blot como descrito acima no Exemplo VI e as manchas foam sondadas tanto com anticorpo pan-específico para IGF-IR SC713 para quantificar os níveis de IGF-IR quanto com anticorpo HRP-PY54 para monitorar os níveis de tirosina fosforilada no IGF-IR ativado.

Conforme observado previamente (Exemplo III), observou-se bloqueio de fosforilação induzida por IGF-I de IGF-IR após o tratamento das células com um anticorpo desta invenção (Figure 4). Além disso, observou-se que este bloqueio da fosforilação induzida por IGF-I foi seguido por baixa regulação do IGF-IR nestas células. Ver, por exemplo, na Figura 4, os níveis de IGF-IR foram reduzidos maximamente 16 horas após estimulação com IGF-I na presença de um anticorpo da invenção.

EXEMPLO VIII: Efeitos dos Anticorpos da Invenção sobre IGF-IR *in vivo*

Determinou-se se os efeitos dos anticorpos da invenção sobre IGF-IR como descrito nos exemplos anteriores ocorreriam *in vivo*. Foram induzidos tumores em camundongos atípicos de acordo com o publicado

- 5 em métodos (V.A. Pollack et al., "Inhibition of epidermal growth factor receptor-associated tyrosine phosphorylation in human carcinomas with CP-358,774: Dynamics of receptor inhibition *in situ* and antitumor effects in athymic mice," *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 291: 739 - 748 (1999). Em resumo, foram injetadas células NIH-3T3 transfectadas com IGF-IR (5×10^6) por via
10 subcutânea em camundongos atípicos de 3 a 4 semanas de idade (*nu/nu*) com 0,2 ml de preparação Matrigel. Em seguida, os camundongos foram injetados com um anticorpo da invenção por via intraperitoneal após se formarem tumores estabelecidos (isto é, cerca de 400 mm^3).

Após 24 horas, os tumores foram extraídos, homogeneizados e
15 determinou-se o nível de IGF-IR. Para determinar os níveis de IGF-IR, diluiu-se o anticorpo SC-713 em tampão de Bloqueio a uma concentração final de $\mu\text{g/ml}$ e foram adicionados 100 μl a cada cavidade de uma lâmina revestida com Reacti-Bind Goat anticoelho (GAR) (Pierce). As lâminas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 hora com agitação e, em seguida, as lâminas foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem. Em seguida, foram pesadas as amostras de tumor que tinham sido preparadas como descrito acima e foram homogeneizadas em tampão de lise (1 ml/100 mg). Foram diluídos 12,5 μl de extrato de tumor com tampão de lise para um volume final de 100 μl e adicionados isto a cada cavidade de uma lâmina de 96 cavidades. As lâminas foram incubadas à temperatura ambiente com agitação por 1 - 2 horas e, em seguida, as lâminas foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem. Em seguida, foram adicionados 100 μl de HRP-PY54 ou anticorpo anti-IGF-IR biotinilado em tampão de Bloqueio a cada cavidade e incubados à temperatura ambiente com agitação por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas cinco vezes com tampão de lavagem e as lâminas foram desenvolvidas. As lâminas sondadas foram desenvolvidas com HRP-PY54 adicionando 100 μl do substrato de microcavidade TMB por

cavidade e o desenvolvimento de cor foi interrompido com a adição de 100 μl de H_2SO_4 a 0,9 M. Em seguida, quantificou-se o sinal a gitando por 10 segundos e medindo $\text{OD}_{450\text{nm}}$. O sinal foi normalizado para proteína total. Lâminas sondadas foram desenvolvidas com anticorpo anti-IGF-IR adicionando 100 μl de estreptavidina-HRP diluído em tampão de Bloqueio a cada cavidade, incubando à temperatura ambiente com agitação por 30 minutos e, em seguida, continuando como descrito para HRP-PY54.

Observou-se que a injeção intraperitoneal de um anticorpo desta invenção, particularmente 2.13.2 e 4.9.2, resultou na inibição da atividade de IGF-IR como medido por uma redução de [tanto IGF-IR fosfotirosina (IGF-IR fosforilado) quanto] proteína IGF-IR total (Figura 6). Além disso, observou-se também uma redução na IGF-IR fosfotirosina (IGF-IR fosforilado) (Figura 5). Sem desejar ser limitado por qualquer teoria, os níveis reduzidos de IGF-IR fosfotirosina podem ser devido aos níveis reduzidos de proteína IGF-IR *in vivo* após tratamento com o anticorpo ou podem ser devido a uma combinação de níveis reduzidos de proteína IGF-IR e uma redução na fosforilação por tirosina no IGF-IR que está presente devido ao bloqueio da ativação por ligante (por exemplo, IGF-I ou IGF-II). Além disso, esta inibição foi responsável à dose do anticorpo injetado (Figura 6). Estes dados demonstram que os anticorpos da invenção são capazes de visar o IGF-IR *in vivo* em um modo análogo ao que observou-se *in vitro*.

EXEMPLO IX: Inibição do Crescimento (TGI) de Tumores Celulares 3T3/IGF-IR

Foi testado se os anticorpos anti-IGF-IR da invenção agiriam inibindo o crescimento tumoral. Tumores foram induzidos como descrito acima (Exemplo VIII) e quando se formaram tumores palpáveis, estabelecidos (isto é, 250 mm^3 , dentro de 6 - 9 dias), os camundongos foram tratados com uma única dose de 0,20 ml de anticorpo por injeção intraperitoneal. Mediu-se o tamanho do tumor por calibradores Vernier através de dois diâmetros a cada três dias e calculou-se o volume usando a fórmula ($\text{comprimento} \times [\text{largura}]^2/2$) usando métodos estabelecidos por Geran, et al., "Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and

another biological systems," Cancer Chemother. Rep. 3: 1 - 104.

Quando esta análise foi realizada com um anticorpo da invenção, descobriu-se que um único tratamento com anticorpo 2.13.2 somente inibiu o crescimento de tumores induzidos por células NIH-3T3 transfectadas com IGF-IR (Figura 7, painel da esquerda). Além disso, em estudos combinados com uma única dose de 7,5 mg/kg de adriamicina fornecida por via intravenosa, observou-se que a administração de uma única dose de 2.13.2 aumentou a eficácia da adriamicina, um inibidor conhecido do crescimento tumoral. A combinação de adriamicina com um anticorpo da invenção, 2.13.2, demonstrou um retardo do crescimento de 7 dias versus o tratamento com o anticorpo ou adriamicina somente (Figura 7, painel da direita).

EXEMPLO X: Relação de Níveis de Anticorpos com Baixa regulação de IGF-IR

Foram induzidos tumores em camundongos pelados como descrito no Exemplo VIII. Os camundongos foram então tratados com 125 µg de 2.13.2 por injeção intraperitoneal, como descrito no Exemplo VIII. Os tumores foram extraídos e os níveis de IGF-IR foram medidos por ELISA como descrito no Exemplo VIII. A Figura 8 mostra os níveis de soro do anticorpo 2.13.2 e os níveis de receptor IGF-IR durante o tempo. O experimento demonstra que o IGF-IR é regulado para baixo pelo anticorpo e que o grau de inibição de IGF-IR é proporcional à dose da concentração sérica do anticorpo.

EXEMPLO XI: Inibição do Crescimento de Tumores 3T3/IGF-IR com Dosegem Múltipla de Anticorpos em Combinação com Adriamicina

Foram induzidos tumores em camundongos pelados como descrito no Exemplo IX. Camundongos com tumores subcutâneos estabelecidos de aproximadamente 250 mm³ foram tratados nos dias 1, 8, 15 e 22 com várias quantidades de anticorpo 2.13.2 (i.p.) ou 7,5 mg/kg de adriamicina (i.v.), ou como agentes únicos ou em combinação, como descrito no Exemplo IX. A Figura 9 mostra o tamanho do tumor em relação aos vários tratamentos durante o tempo. O experimento demonstra que o tratamento com um anticorpo anti-IGF-IR administrado uma vez a cada sete dias inibe o

crescimento de células tumorais e aumenta a inibição do crescimento de células tumorais em combinação com adriamicina, um inibidor conhecido tumoral.

EXEMPLO XII: Inibição do Crescimento de Tumores Grandes

5 Foram induzidos tumores em camundongos pelados como descrito no Exemplo IX. Camundongos com grandes tumores subcutâneos estabelecidos de ligeiramente menos do que 2000 mm³ foram tratados nos dias 1 e 8 com várias quantidades de anticorpo 2.13.2 (i.p.) ou 7,5 mg/kg de adriamicina (i.v.), ou como agentes únicos ou em combinação, como descrito
10 no Exemplo IX. A Figura 10 mostra o tamanho do tumor em relação aos vários tratamentos durante o tempo. Grupos de animais de controle, somente anticorpo e adriamicina somente foram terminados no dia 5, quando o tamanho do tumor excedeu 2000 mm³. O experimento demonstra que o tratamento com um anticorpo anti-IGF-IR em combinação com adriamicina é altamente eficaz contra tumores grandes quando são administradas múltiplas doses.
15

EXEMPLO XIII: Inibição do Crescimento de Tumores de Células Colorerais

Foram induzidos tumores em camundongos pelados como descrito no Exemplo IX exceto que foram usadas células Colo 205 (ATCC CCL 20 222). Células Colo 205 são células de adenocarcinoma colo-retal humano. Camundongos com tumores subcutâneos estabelecidos de aproximadamente 250 mm³ foram tratados com várias quantidades de anticorpo 2.13.2 (i.p.) ou com 100 mg/kg de 5-fluorodesoxiuridina (5-FU, i.v.), ou como agentes únicos ou em combinação, como descrito no Exemplo IX, Figura 11
25 mostra o tamanho dos tumores em relação aos vários tratamentos durante o tempo. O experimento demonstra que o tratamento com um anticorpo anti-IGF-IR administrado uma vez inibe o crescimento de células de câncer colo-retal humano quando fornecido como um único agente e aumenta a eficácia de 5-FU, um conhecido inibidor tumoral.

30 Camundongos com tumores de Colo 205 estabelecidos foram tratados nos dias 1, 8, 15 e 22 com 500 µg 2.13.2 (i.p.), 100 mg/kg 5-FU (i.v.) ou uma combinação dos mesmos. A Figura 12 mostra o tamanho dos

tumores em relação aos vários tratamentos durante o tempo. O experimento demonstra que o tratamento com um anticorpo anti-IGF-IR administrado uma vez a cada sete dias inibe o crescimento de células de câncer colo-rectal humano e aumenta a eficácia de 5-FU.

5 EXEMPLO XIV: Inibição do Crescimento de Tumores de Células de Câncer de Mama

Camundongos pelados como descrito no Exemplo VIII foram implantados com péletes de estrogênio biodegradáveis (0,72 mg de 17-β-estradiol/pélete, liberação em 60 dias; Innovative Research of America).

- 10 10 Após 48 horas, os tumores foram induzidos em camundongos pelados essencialmente como descrito no Exemplo IX exceto que foram usadas células MCF-7 (ATCC HTB-22). As células MCF-7 são células de carcinoma de mama humano dependente de estrogênio. Os camundongos com tumores subcutâneos estabelecidos de aproximadamente 250 mm³ foram tratados
15 15 com 50 µg do anticorpo 2.13.2 (i.p.) nos dias 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19 e 22 (q3dx7) ou com 6,25 mg/kg de taxol (i.p.) nos dias 1, 2, 3, 4, 5 (qldx5), ou como agentes únicos ou em combinação, essencialmente como descrito no Exemplo IX. A Figura 13 mostra o tamanho do tumor em relação aos vários tratamentos durante o tempo. O experimento demonstra que o tratamento
20 20 com um anticorpo anti-IGF-IR por si só inibe o crescimento de células de câncer de mama humano quando administrado uma vez a cada três dias e também aumenta a eficácia do taxol, um conhecido inibidor do câncer de mama, quando administrados em combinação.

- 25 25 Camundongos tendo tumores estabelecidos de células MCF-7 como descrito imediatamente acima foram tratados no dia 1 com várias quantidades de anticorpo 2.13.2 (i.p.) somente ou com 3,75 mg/kg de adriamicina (i.v.), essencialmente como descrito no Exemplo IX. A Figura 14 mostra o tamanho do tumor em relação aos vários tratamentos durante o tempo. O experimento demonstra que um único tratamento com um anticorpo anti-IGF-IR por si só inibe o crescimento de células do câncer de mama humano e reforça a eficácia da adriamicina, um conhecido inibidor tumoral.
30 30

Camundongos tendo tumores estabelecidos de células MCF-7

como descrito imediatamente acima foram tratados com 250 µg do anticorpo 2.13.2 (i.p.) nos dias 1, 8, 15 e 23 ou com um pélete de tamoxifen biodegradável (25 mg/pílula, base livre, liberação em 60 dias, Innovative Research of America), ou como agentes únicos ou em combinação, essencialmente 5 como descrito no Exemplo IX. O pélete de tamoxifen foi implantado no dia 1 após o tumor ter se estabelecido. A Figura 15 mostra o tamanho do tumor em relação aos vários tratamentos durante o tempo. O experimento demonstra que o tratamento com um anticorpo anti-IGF-IR administrado uma vez a cada sete dias inibe o crescimento de câncer de mama humano por si 10 só e aumenta a eficácia do tamoxifen, um conhecido inibidor tumoral.

EXEMPLO XVI: Inibição do Crescimento de Tumores de Células de Carcinoma Epidermóide

Foram induzidos tumores em camundongos pelados essencialmente como descrito no Exemplo IX exceto que foram usadas células A431 15 (ATCC CRL 1555). As células A431 são células de carcinoma epidermóide humano que superexpressam EGFR. Camundongos com tumores subcutâneos estabelecidos de aproximadamente 250 mm³ foram tratados nos dias 1, 8, 15, 22 e 29 com 500 µg do anticorpo 2.13.2 (i.p.) ou foram tratados uma vez ao dia por 27 dias com 10 mg/kg CP-358.774 administrado por via oral 20 (p.o.), ou como agentes únicos ou em combinação, como descrito no Exemplo IX. CP-358.774 é descrito na Patente dos Estados Unidos Nº 5.747.498 e em Moyer et al., Cancer Research 57: 4838 - 4848 (1997), incorporados a este relatório por meio de referência. A Figura 16 mostra o tamanho do tumor em relação aos vários tratamentos durante o tempo. O experimento demonstra que o tratamento com um anticorpo anti-IGF-IR aumenta a eficácia 25 de CP-358.774, um conhecido inibidor de EGF-R tirosina quinase, inibindo o crescimento de um tumor de carcinoma epidermóide humano.

EXEMPLO XVII: Farmacocinética de Anticorpos Anti-IGF-IR *in vivo*

Para avaliar a farmacocinética dos anticorpos anti-IGF-IR, macacos cynomolgus foram injetados por via intravenosa com 3, 30 ou 100 30 mg/kg de anticorpo 2.13.2 em um tamão de acetato. O soro foi colhido dos macacos em vários pontos do tempo e foram determinadas as concentra-

- ções de anticorpo anti-IGF-IR nos macacos por um período de até níveis de dez semanas. Para quantificar os níveis de soro de anticorpos funcionais, o domínio extracelular do IGF-IR humano (IGF-I-sR, R&D Systems, Catálogo Nº 391GR) foi ligado a lâminas de 96 cavidades. O soro de macacos (diluído entre 1 : 100 e 1 : 15.000) foi adicionado às lâminas de teste de modo que cada amostra estaria dentro do alcance linear da curva padrão e seria incubada sob condições nas quais qualquer anticorpo anti-IGF-IR ligaria ao IGF-I-sR. Após lavar as lâminas, um anticorpo de IgG anti-humana marcado foi adicionado às lâminas e incubado sob condições nas quais o anticorpo de IgG anti-humana ligaria ao anticorpo anti-IGF-IR. As lâminas foram, então, lavadas e desenvolvidas, e uma curva padrão de controle e ajustes de regressão linear usados para quantificar a quantidade de anticorpos anti-IGF-IR. A Figura 17 mostra a concentração de 2.13.2 no soro durante o tempo. O experimento demonstra que a meia-vida do anticorpo anti-IGF-IR é de 4,6 a 7,7 dias e tem uma distribuição de volume de 74 - 105 mL/kg. Além disso, o experimento demonstra que as quantidades administradas são proporcionais às doses no macaco, o que indica que o anticorpo anti-IGF-IR saturou quaisquer sítios de ligação de IGF-IR disponíveis no corpo mesmo na menor dose de 3 mg/kg.
- 20 **EXEMPLO XVIII: Combinação de terapias de Anticorpo Anti-IGF-IR e Adriamicina Regula para baixo IGF-IR *in vivo***
- Foram induzidos tumores em camundongos pelados como descrito no Exemplo IX. Camundongos com tumores subcutâneos estabelecidos de aproximadamente 400 mm³ foram tratados com uma única injeção de 250 µg do anticorpo 2.13.2 (i.p.) ou com 7,5 mg/kg de adriamicina (i.v.), ou como agentes únicos ou em combinação, como descrito no Exemplo IX. 72 horas após a administração dos agentes, os tumores foram extraídos como descrito no Exemplo VIII, e quantidades iguais dos extratos tumorais foram submetidas à eletroforese de gel de poliacrilamida de dodecil fosfato de sódio (SDS PAGE) e análise western blot usando o anticorpo anti-IGF-IR SC-713 (Santa Cruz). A Figura 18 mostra as quantidades de IGF-IR em células tumorais em animais de controle (primeiras três alamedas de cada painel),

em animais tratados com somente anticorpo (painedel superior), em animais tratados com somente adriamicina (painedel do meio) e em animais tratados com anticorpo e adriamicina (painedel inferior). Cada alameda representa quantidades iguais de proteína de tumores individuais de camundongos individuais.

5 O experimento demonstra que o tratamento com adriamicina somente tem pouco efeito sobre os níveis de IGF-IR e que o tratamento com somente anticorpo mostra alguma redução nos níveis de IGF-IR. Surpreendentemente, o tratamento com adriamicina e anticorpo juntos mostram uma dramática redução nos níveis de IGF-IR, demonstrando que adriamicina e

10 anticorpo regulam para baixo bastante os níveis de IGF-IR.

Todas as publicações e pedidos de patente citados neste relatório são aqui incorporados por meio de referência como se cada publicação ou pedido de patente individual fosse especificamente e individualmente indicado a ser incorporado por meio de referência. Embora a invenção precedente tenha sido descrita em alguns detalhes a título de ilustração e exemplo para fins de clareza do entendimento, será prontamente evidente para os versados na técnica à luz dos ensinamentos desta invenção que podem ser feitas algumas alterações e modificações na mesma sem se afastar do espírito ou do âmbito das reivindicações anexadas.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal humano ou porção de ligação de antígeno do mesmo que se liga especificamente ao receptor de fator de crescimento I semelhante à insulina (IGF-IR), caracterizado pelo fato de que compreende todas as sequências de aminoácidos das CDR de:
- 5 (1) um domínio variável selecionado do grupo consistindo em:
- 10 a) um domínio variável da cadeia leve de um anticorpo selecionado do grupo consistindo em 2.12.1, um anticorpo produzido pelo hibridoma depositado na ATCC sob número de depósito PTA-2792; e 2.13.2, um anticorpo produzido pelo hibridoma depositado na ATCC sob número de depósito PTA-2788;
- 15 b) um domínio variável de uma cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NO: 2 e SEQ ID NO: 6;
- 20 c) um domínio variável da cadeia pesada de um anticorpo selecionado do grupo consistindo em 2.12.1 e 2.13.2; e
- 25 d) um domínio variável de uma cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 8; ou
- 20 (2) os domínios variáveis da cadeia leve e da cadeia pesada de um anticorpo selecionado do grupo consistindo em 2.12.1 e 2.13.2.
- 25 2. Anticorpo monoclonal ou porção de ligação de antígeno do mesmo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou porção do mesmo tem no mínimo uma propriedade selecionada do grupo consistindo em:
- 30 a) não se liga ao IGF-IR de camundongo, rato, cachorro ou coelho;
- b) se liga ao IGF-IR de *cinomologous* ou *rhesus*, mas não ao IGF-IR de sagui;
- c) inibe a ligação de IGF-I ou IGF-II a IGF-IR;
- d) tem uma seletividade para IGF-IR que é no mínimo 50 vezes maior do que sua seletividade para receptor de insulina;
- e) inibe crescimento tumoral *in vivo*;

- f) causa desaparecimento de IGF-IR da superfície celular quando incubado com uma célula expressando IGF-IR;
- g) inibe fosforilação de tirosina induzida por IGF-IR; e
- i) tem uma taxa baixa para IGF-IR de K_{off} de 10^{-4} ou menor.

5 3. Anticorpo monoclonal ou porção de ligação de antígeno do mesmo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo ou porção do mesmo tem todas as referidas propriedades.

10 4. Anticorpo monoclonal ou porção de ligação de antígeno do mesmo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo ou porção do mesmo inibe a ligação de IGF-I ou IGF-II a IGF-IR, se liga ao IGF-IR com um K_d de 8×10^{-9} M ou menos e tem uma seletividade para IGF-IR que é no mínimo 50 vezes maior do que sua seletividade para receptor de insulina.

15 5. Anticorpo monoclonal ou porção de ligação de antígeno do mesmo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo ou porção do mesmo tem no mínimo uma propriedade selecionada do grupo consistindo em:

- a) competição cruzada para ligação a IGF-IR com um anticorpo selecionado do grupo consistindo em 2.12.1 e 2.13.2;
- b) ligação ao mesmo epítopo de IGF-IR que um anticorpo selecionado do grupo consistindo em 2.12.1 e 2.13.2;
- c) ligação ao mesmo antígeno que o ligado pelo anticorpo selecionado do grupo consistindo em 2.12.1 e 2.13.2;
- d) ligação a IGF-IR com substancialmente o mesmo K que um anticorpo selecionado do grupo consistindo em 2.12.1 e 2.13.2; e
- e) ligação a IGF-IR com substancialmente a mesma faixa baixa que um anticorpo selecionado do grupo consistindo em 2.12.1 e 2.13.2.

30 6. Anticorpo monoclonal ou porção de ligação de antígeno do mesmo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo ou porção do mesmo inibe a ligação entre IGF-IR e IGF-I ou IGF-II com um IC_{50} de menos de 100 nM.

7. Anticorpo monoclonal ou porção de ligação de antígeno do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo comprehende um domínio variável de uma cadeia leve κ, em que a sequência do referido domínio variável da referida cadeia leve κ comprehende uma sequência de aminoácidos codificada por uma linhagem germinativa do gene V_κ A30, A27 ou O12.

5 8. Anticorpo monoclonal ou porção de ligação de antígeno do mesmo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o domínio variável da cadeia leve κ comprehende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo consistindo na sequência de aminoácidos da SEQ ID Nº: 2 e SEQ ID NO: 6.

10 9. Anticorpo monoclonal ou porção de ligação de antígeno do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo comprehende um domínio variável de uma cadeia pesada, em que a sequência de aminoácido do referido domínio variável comprehende uma sequência de aminoácidos codificada por uma linhagem germinativa do gene V_H DP47, DP35, DP71 ou VIV-4.

15 20 10. Anticorpo monoclonal ou porção de ligação de antígeno do mesmo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que sequência de aminoácidos do domínio variável da cadeia pesada comprehende a sequência de aminoácidos do domínio variável selecionada do grupo consistindo na sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 8.

25 11. Anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que é uma imunoglobulina G (IgG), uma molécula IgM, uma IgE, uma IgA ou uma IgD, um anticorpo de cadeia única ou um anticorpo biespecífico ou é derivado das mesmas.

30 12. Porção de ligação de antígeno de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de que é um fragmento Fab, um fragmento F(ab')₂, um fragmento F_v.

13. Anticorpo monoclonal ou porção de ligação de antígeno do

mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo ou porção comprehende todas as sequências de aminoácidos de pelo menos uma das regiões CDR de um domínio variável, em que o referido domínio variável é selecionado do grupo consistindo

5 em:

- a) um domínio variável da cadeia leve de um anticorpo selecionado do grupo consistindo em 2.12.1 e 2.13.2;
- b) um domínio variável de uma cadeia leve comprendendo uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NO: 2 e SEQ
10 ID NO: 6, ou uma sequência de aminoácidos tendo 1 - 10 inserções, eliminações ou substituições de aminoácidos da mesma;
- c) um domínio variável da cadeia pesada de um anticorpo selecionado do grupo consistindo em 2.12.1 e 2.13.2; e
- d) um domínio variável de uma cadeia pesada comprendendo uma sequência de aminoácidos selecionada de SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 8, ou uma sequência de aminoácidos tendo 1 - 10 inserções, eliminações ou substituições de aminoácidos da
15 mesma; e
- e) os domínios variáveis da cadeia leve e da cadeia pesada de um anticorpo selecionado do grupo consistindo em 2.12.1 e 2.13.2.

14. Anticorpo monoclonal ou porção de ligação de antígeno do mesmo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é selecionado do grupo consistindo em 2.12.1 e 2.13.2.

15. Anticorpo monoclonal ou porção de ligação de antígeno do mesmo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo ou porção comprehende uma cadeia pesada e uma cadeia leve, e em que as sequências de aminoácidos da cadeia leve e da cadeia pesada são selecionadas do grupo consistindo em:

- a) a sequência de aminoácidos da cadeia pesada e a sequência de aminoácidos da cadeia leve de 2.12.1;
- b) a sequência de aminoácidos da cadeia pesada e a sequência de aminoácidos da cadeia leve de 2.13.2;

- c) a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 45 e a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 47; e
- d) a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 49 e a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 51.

5 16. Anticorpo monoclonal ou porção de ligação de antígeno do mesmo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo ou porção tem uma sequência de aminoácidos compreendendo as sequências de aminoácidos das CDRs de anticorpos 2.12.1 ou 2.13.2.

10 17. Anticorpo monoclonal que se liga especificamente a IGF-IR, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo compreende uma sequência de aminoácido de cadeia pesada compreendendo as sequências de aminoácido CDR1, CDR2 e CDR3 de SEQ ID NO:4 e em que o referido anticorpo compreende ainda uma sequência de aminoácido de cadeia leve 15 compreendendo as sequências de aminoácidos CDR1, CDR2 e CDR3 de SEQ ID NO:2.

18. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácido de cadeia pesada compreende a sequência de aminoácido do domínio variável de SEQ ID NO: 20 4 ou a referida sequência com até 5 substituições de aminoácido conservadoras e a sequência de aminoácido de cadeia leve compreende a sequência de aminoácido do domínio variável de SEQ ID NO: 2 ou a referida sequência com até 5 substituições de aminoácido.

19. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácido de cadeia pesada compreende a sequência de aminoácido do domínio variável de SEQ ID NO: 4 e a sequência de aminoácido de cadeia leve compreende a sequência de aminoácido do domínio variável de SEQ ID NO: 2.

20. Anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 19, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácido de cadeia pesada compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 49, sem a sequência sinal, e a sequência de aminoácido de cadeia leve

compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 51, sem a sequência sinal.

21. Anticorpo monoclonal que se liga especificamente a IGF-IR, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo comprehende uma sequência de aminoácido de cadeia pesada comprendendo as sequências de aminoácido CDR1, CDR2 e CDR3 de SEQ ID NO:8 e em que o referido anticorpo comprehende ainda uma sequência de aminoácido de cadeia leve comprendendo as sequências de aminoácidos CDR1, CDR2 e CDR3 de SEQ ID NO:6.

10 22. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácido de cadeia pesada comprehende a sequência de aminoácido do domínio variável de SEQ ID NO: 8 ou a referida sequência com até 5 substituições de aminoácido conservadoras e a sequência de aminoácido de cadeia leve comprehende a sequência de aminoácido do domínio variável de SEQ ID NO: 6 ou a referida sequência com até 5 substituições de aminoácido.

15 23. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácido de cadeia pesada comprehende a sequência de aminoácido do domínio variável de SEQ ID NO: 8 ou a sequência de aminoácido de cadeia leve comprehende a sequência de aminoácido da região variável de SEQ ID NO: 6.

20 24. Anticorpo monoclonal de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 23, caracterizado pelo fato de que a sequência de aminoácido de cadeia pesada comprehende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 45, sem a sequência sinal, e a sequência de aminoácido de cadeia leve comprehende a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 47, sem a sequência sinal.

25 25. Anticorpo monoclonal que se liga especificamente a IGF-IR, caracterizado pelo fato de que o referido anticorpo é selecionado do grupo consistindo em:

a) um anticorpo comprendendo a sequência de aminoácido de domínio variável de cadeia pesada SEQ ID NO: 3 e a sequência de aminoá-

cido de domínio variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 1; e

b) um anticorpo compreendendo a sequência de aminoácido de domínio variável de cadeia pesada SEQ ID NO: 7 e a sequência de aminoácido de domínio variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 5.

5 26. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo monoclonal, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 25, ou porção de ligação de antígeno, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10 ou 12 a 16, e um veículo farmaceuticamente aceitável, em que o veículo é selecionado do grupo consistindo
10 em citrato de sódio, água, salina, salina tamponada com fosfato, dextrose, glicerol e etanol.

27. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 26, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um agente antineoplásico, quimioterápico, anti-angiogênico ou antitumoral.

15 28. Processo para preparar um anticorpo monoclonal anti-IGF-IR ou porção de ligação de antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

- a) imunizar um animal transgênico não-humano que é capaz de produzir anticorpos humanos com um imunógeno compreendendo IGF-IR;
- b) permitir o animal transgênico a criar uma resposta imune a IGF-IR; e
- c) recuperar o anticorpo ou uma porção de ligação de antígeno do mesmo.

25 29. Molécula de ácido nucléico isolada, caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência de ácidos nucléicos que codifica uma cadeia pesada ou porção de ligação de antígeno do mesmo ou uma cadeia leve ou porção de ligação de antígeno do mesmo de um anticorpo monoclonal, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 25.

30 30. Molécula de ácido nucléico isolada de acordo com a reivindicação 29, caracterizada pelo fato de que a referida molécula de ácido nucléico compreende uma sequência de ácidos nucléicos selecionada do gru-

po consistindo em:

- a) uma sequência de ácido nucléico codificando no mínimo uma região CDR da cadeia pesada do anticorpo selecionado do grupo consistindo em 2.12.1 e 2.13.2;
 - 5 b) uma sequência de ácido nucléico codificando as três regiões CDR da cadeia pesada do anticorpo selecionado do grupo consistindo em 2.12.1 e 2.13.2;
 - c) uma sequência de ácidos nucléicos codificando a sequência de aminoácidos da cadeia pesada ou a porção de ligação de antígeno do mesmo do anticorpo selecionado do grupo consistindo em 2.12.1 e 2.13.2;
 - 10 d) uma sequência de ácidos nucléicos codificando no mínimo uma região CDR da cadeia leve do anticorpo selecionado do grupo consistindo em 2.12.1 e 2.13.2;
 - e) uma sequência de ácidos nucléicos codificando as três regiões CDR da cadeia pesada do anticorpo selecionado do grupo consistindo em 2.12.1 e 2.13.2;
 - 15 f) uma sequência de ácidos nucléicos codificando a sequência de aminoácidos da cadeia leve ou a porção de ligação de antígeno do mesmo do anticorpo selecionado do grupo consistindo em 2.12.1 e 2.13.2;
 - g) uma sequência de ácidos nucléicos codificando a sequência de aminoácidos de selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOS: 2, 4, 6 e 8; e
 - 20 h) uma sequência de ácidos nucléicos selecionada do grupo consistindo em SEQ ID NOS: 1, 3, 5 e 7;
- em que a referida molécula de ácido nucléico opcionalmente compreende uma sequência de ácidos nucléicos codificando a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 28 ou SEQ ID NO: 26.
- 30 31. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende a molécula de ácido nucléico, como definida na reivindicação 29 ou 30, em que o vetor opcionalmente compreende uma sequência controle de expressão ligada

operavelmente à molécula de ácido nucléico.

32. Método para preparar um anticorpo monoclonal anti-IGF-IR ou porção de ligação de antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende cultivar a célula hospedeira, que compreende o vetor como definido na reivindicação 31 ou a molécula de ácido nucléico como definida na reivindicação 29 ou 30, ou a linhagem germinativa que produz o anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 25, sob condições adequadas e recuperar o referido anticorpo ou porção de ligação de antígeno.

P10116726

1/25

2.13.2K	GACATCCAGA TGACCCAGTT TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA	50
A30	GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA	50
2.14.3K	----- TCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA	26
2.12.1K	----- TGCAT CTGTAGGAGA	15
4.9.2K	GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA	50
Consenso	GACATCCAGA TGACCCAGTY TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA	50
CDR1		
2.13.2K	CAGAGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GG CATTAGA AATGATTTAG	100
A30	CAGAGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GG CATTAGA AATGATTTAG	100
2.14.3K	CAGAGTCACC TTCACTTGCC GGGCAAGTCA GG CATTAGA CCTGATTTAG	76
2.12.1K	CAGAGTCACC TTCACTTGCC GGGCAAGTCA GG CATTAGA CCTGATTTAG	65
4.9.2K	CAGAGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GG CATTAGA ACTGATTTAG	100
Consenso	CAGAGTCACC WTCACTTGCC GGGCAAGTCA GG CATTAGA MRTGATTTAG	100
CDR2		
2.13.2K	GCTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCC CTAAGCGCCT GATCTATGCT	150
A30	GCTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCC CTAAGCGCCT GATCTATGCT	150
2.14.3K	GCTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCT CTAAGCGCCT GATCTATGCT	126
2.12.1K	GCTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCT CTAAGCGCCT GATCTATGCT	115
4.9.2K	GCTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCC CTAAGCGCCT GATCTATGCT	150
Consenso	GCTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCYC CTAAGCGCCT GATCTATGCT	150
CDR3		
2.13.2K	GCATCCCGTT TCACTCAGGG GGTCCCATCA AGGTTCAGCG GCAGTGGATC	200
A30	GCATCCAGTT TCAACTCAGGG GGTCCCATCA AGGTTCAGCG GCAGTGGATC	200
2.14.3K	GCATCCCGTT TCAAAAGTGG GGTCCCATCA AGGTTCAGCG GCAGTGGATC	176
2.12.1K	GCATCCCGTT TCAAAAGTGG GGTCCCATCA AGGTTCAGCG GCAGTGGATC	165
4.9.2K	GCATCCAAAT TCAACCGTGG GGTCCCATCA AGGTTCAGCG GCAGTGGATC	200
Consenso	GCATCCMRWT TCACTCAGGG GGTCCCATCA AGGTTCAGCG GCAGTGGATC	200
2.13.2K	TGGGACAGAA TTCACTCTCA CAATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGATTTTG	250
A30	TGGGACAGAA TTCACTCTCA CAATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGATTTTG	250
2.14.3K	TGGGACAGAA TTCACTCTCA CAATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGATTTTG	226
2.12.1K	TGGGACAGAA TTCACTCTCA CAATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGATTTTG	215
4.9.2K	TGGGACAGAA TTCACTCTCA CAATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGATTTTG	250
Consenso	TGGGACAGAA TTCACTCTCA CAATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGATTTTG	250
2.13.2K	CAACTTATTA CTGTCTACAG CATAATAGTT ACCCGTGCAG TTTTGGCCAG	300
A30	CAACTTATTA CTGTCTACAG CATAATAGTT ACCCG-TCCN-----	288
2.14.3K	CAACTTATTA CTGTCTACAG CATAATAATT ATCCCTGGAC GTTCGGCAA	276
2.12.1K	CAACTTATTA CTGTCTACAG CATAATAATT ATCCCTGGAC GTTCGGCAA	265
4.9.2K	CAACTTATTA CTGTCTACAG CATAATAGTT ACCCTCTCAC TTTCGGCGGA	300
Consenso	CAACTTATTA CTGTCTACAG CATAATAATT ACCCKYBSNS KTTYGGCSRR	300
2.13.2K	GGGACCAAGC TGGAGATCAA AC---	322
A30	----- -----	288
2.14.3K	GGGACCGAGG TGGAAATCAT ACGAAC	302
2.12.1K	GGGACCGAGG TGGAAATCAT ACGAAC	291
4.9.2K	GGGACCAAGG TGGAGATCAA AC---	322
Consenso	GGGACCRAGS TGGARATCAW ACGAAC	326

FIG. 1A

P10116728

2/25

4.17.3K	-----	-----	-----	AGGAGA	7
012	GACATCCAGA	TGACCCAGTC	TCCATCCTCC	CTGTCAGTCAT	CTGTAAGGAGA
Consenso	GACATCCAGA	TGACCCAGTC	TCCATCCTCC	CTGTCAGTCAT	CTGTAAGGAGA
CDR1					
4.17.3K	CAGAGTCACC	ATCACTTGCC	GGGCAAGTCA	GAGCATTAGT	ACCTTTTAA
012	CAGAGTCACC	ATCACTTGCC	GGGCAAGTCA	GAGCATTAGC	ACCTTTTAA
Consenso	CAGAGTCACC	ATCACTTGCC	GGGCAAGTCA	GAGCATTAGY	ACCTTTTAA
CDR2					
4.17.3K	ATTGGTATCA	GCAGAAACCA	GGGAAAGCCC	CTAA	CTCCT GATCCTATGT
012	ATTGGTATCA	GCAGAAACCA	GGGAAAGCCC	CTAA	CTCCT GATCCTATGT
Consenso	ATTGGTATCA	GCAGAAACCA	GGGAAAGCCC	CTAA	CTCCT GATCCTATGT
CDR3					
4.17.3K	GCATCCAGTT	TCAACTGTGG	GGTCCCCTCA	AGGTTCAAGTG	GCAGTGGATC
012	GCATCCAGTT	TCAACTGTGG	GGTCCCCTCA	AGGTTCAAGTG	GCAGTGGATC
Consenso	GCATCCAGTT	TCAACTGTGG	GGTCCCCTCA	AGGTTCAAGTG	GCAGTGGATC
4.17.3K	TGGGACAGAT	TTCACTCTCA	CCATCAGCAG	TCTGCAACCT	GAAGATTTG
012	TGGGACAGAT	TTCACTCTCA	CCATCAGCAG	TCTGCAACCT	GAAGATTTG
Consenso	TGGGACAGAT	TTCACTCTCA	CCATCAGCAG	TCTGCAACCT	GAAGATTTG
CDR3					
4.17.3K	CAACTTACTA	CTGTCAACAG	AGTTACATG	CCCCACTCAC	TTTCGGCGGA
012	CAACTTACTA	CTGTCAACAG	AGTTACATG	CCCC-TCC-	-----
Consenso	CAACTTACTA	CTGTCAACAG	AGTTACATG	CCCCYYCHC	TTTCGGCGGA
4.17.3K	GGGACCAAGG	TGGAGATCAA	AC		279
012	-----	-----	-----		288
Consenso	GGGACCAAGG	TGGAGATCAA	AC		322

FIG. 1B

165

Printed 16726

3/25

6.1.1K	GAAATTGTG TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTGT CTCCAGGGAA	50
A27	GAAATTGTG TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTGT CTCCAGGGAA	50
	CDR1	
6.1.1K	-AGAGGCCACC CTCTCCTGTA GGGCCAGTCA GAGTGTTCGC GGCAGGFACT	49
A27	AAGAGGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTCAGC AGCAGGFACT	100
Consenso	AAGAGGCCACC CTCTCCTGTA GGGCCAGTCA GAGTGTTCGC RGCGAGSTACT	100
	CDR2	
6.1.1K	TAGCCTGGTA CCAGCAGAAA CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT	99
A27	TAGCCTGGTA CCAGCAGAAA CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT	150
Consenso	TAGCCTGGTA CCAGCAGAAA CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT	150
	CDR3	
6.1.1K	GGTGATCCA GCAGGGCCAC TGGCATCCCA GACAGGTTCA GTGGCAGTGG	149
A27	GGTGATCCA GCAGGGCCAC TGGCATCCCA GACAGGTTCA GTGGCAGTGG	200
Consenso	GGTGATCCA GCAGGGCCAC TGGCATCCCA GACAGGTTCA GTGGCAGTGG	200
	CDR3	
6.1.1K	GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG CCTGAAGATT	199
A27	GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG CCTGAAGATT	250
Consenso	GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG CCTGAAGATT	250
	CDR3	
6.1.1K	TTGCAGTGT TTACTGTCAG CAGTATGGTA GTCACCTCG NACGTTGGC	249
A27	TTGCAGTGT TTACTGTCAG CAGTATGGTA GTCACCTCG -----	290
Consenso	TTGCAGTGT TTACTGTCAG CAGTATGGTA GTCACCTCG NACGTTGGC	300
	CDR3	
6.1.1K	CAAGGGACCA AGGTGGAAT CAAAC	274
A27	-----	290
Consenso	CAAGGGACCA AGGTGGAAT CAAAC	325

FIG. 1C

P10116723

4/25

2.12.1H	-----	GGGAGGC TTGGTCAAGC CTGGAA GGTC	26
DP35	CAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTCAAGC CTGGAGGGTC	50	
Consenso	CAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTCAAGC CTGGAGGGTC	50	
		CDR1	
2.12.1H	CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACATTCAGT GACTACTATA	76	
DP35	CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACATTCAGT GACTACTATA	100	
Consenso	CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACATTCAGT GACTACTATA	100	
2.12.1H	TGAGCTGGAT CCCCCAGGCT CCAGGGAAAGG GGCTGGATG GGTTTCATAC	126	
DP35	TGAGCTGGAT CCCCCAGGCT CCAGGGAAAGG GGCTGGATG GGTTTCATAC	150	
Consenso	TGAGCTGGAT CCCCCAGGCT CCAGGGAAAGG GGCTGGATG GGTTTCATAC	150	
	CDR2		
2.12.1H	ATTAGTAGTA GTGGTAGTAC CAGAGACTAC GCAGACTCTG TGAAGGGCCG	176	
DP35	ATTAGTAGTA GTGGTAGTAC CATAAATACAC GCAGACTCTG TGAAGGGCCG	200	
Consenso	ATTAGTAGTA GTGGTAGTAC CATAAATACAC GCAGACTCTG TGAAGGGCCG	200	
2.12.1H	ATTCACCATC TCCAGGGACA ACGCCAAGAA CTCACTGTAT CTGCAAATGA	226	
DP35	ATTCACCATC TCCAGGGACA ACGCCAAGAA CTCACTGTAT CTGCAAATGA	250	
Consenso	ATTCACCATC TCCAGGGACA ACGCCAAGAA CTCACTGTAT CTGCAAATGA	250	
2.12.1H	ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGT GAGAGATGGA	276	
DP35	ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGT GAGAGA---	296	
Consenso	ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGT GAGAGATGGA	300	
	CDR3		
2.12.1H	GTGGAAACTA CTTTTTACTA CTACTACTAC GGTATGGACG TCTGGGGCCA	326	
DP35	-----	296	
Consenso	GTGGAAACTA CTTTTTACTA CTACTACTAC GGTATGGACG TCTGGGGCCA	350	
2.12.1H	AGGGACCACG GTCACCGTCT CCTCAG	352	
DP35	-----	296	
Consenso	AGGGACCACG GTCACCGTCT CCTCAG	376	

FIG. 2A

P10116728

5/25

PF2-2.14.3H.DNA	-----	-----	GGGCCCCAGGA CTGGTGAAGC CTTCGGAGAC	30
VIV-4/4.35	CAGGTGCAGC TGCAGGGAGTC	GGGCCCCAGGA CTGGTGAAGC CTTCGGAGAC	50	
Consenso	CAGGTGCAGC TGCAGGGAGTC	GGGCCCCAGGA CTGGTGAAGC CTTCGGAGAC	50	
			CDR1	
PF2-2.14.3H.DNA	CCCTGTCCCTC ACCTGCAC TG TCTCTGGTGG CTCCATCACT	ATTACTACT	80	
VIV-4/4.35	CCCTGTCCCTC ACCTGCAC TG TCTCTGGTGG CTCCATCACT	ATTACTACT	100	
Consenso	CCCTGTCCCTC ACCTGCAC TG TCTCTGGTGG CTCCATCACT	ATTACTACT	100	
			CDR1	
PF2-2.14.3H.DNA	GGAGCTGGAT CCCGCAGCCC GCGGGGAAGG GACTGGAGTG GATTGGCGT	130		
VIV-4/4.35	GGAGCTGGAT CCCGCAGCCC GCGGGGAAGG GACTGGAGTG GATTGGCGT	150		
Consenso	GGAGCTGGAT CCCGCAGCCC GCGGGGAAGG GACTGGAGTG GATTGGCGT	150		
			CDR2	
PF2-2.14.3H.DNA	ATCTATACCA GTGGGAGGCC CAACTACAAC CCCTCCCTCA AGAGTCGAGT	180		
VIV-4/4.35	ATCTATACCA GTGGGAGGCC CAACTACAAC CCCTCCCTCA AGAGTCGAGT	200		
Consenso	ATCTATACCA GTGGGAGGCC CAACTACAAC CCCTCCCTCA AGAGTCGAGT	200		
PF2-2.14.3H.DNA	CACCATGTCA GTAGACACGT CCAAGAACCA GTTCTCCCTG AAGCTGA	230		
VIV-4/4.35	CACCATGTCA GTAGACACGT CCAAGAACCA GTTCTCCCTG AAGCTGA	250		
Consenso	CACCATGTCA GTAGACACGT CCAAGAACCA GTTCTCCCTG AAGCTGA	250		
PF2-2.14.3H.DNA	CTGTGACCGC CGCGGACACG GCGCTGTATT ACTGTGCGGT AACGATTTT	280		
VIV-4/4.35	CTGTGACCGC CGCGGACACG GCGCTGTATT ACTGTGCGGT	288		
Consenso	CTGTGACCGC CGCGGACACG GCGCTGTATT ACTGTGCGGT AACGATTTT	300		
			CDR3	
PF2-2.14.3H.DNA	GGAGTGGTTA TTATCTTGAGA CTACTGGGGC CAGGAGACCC TGGTCACCGT	330		
VIV-4/4.35	-----	AGAGAGAG-----	294	
Consenso	GGAGTGGTTA TTATCTTGAGA CTACTGGGGC CAGGAGACCC TGGTCACCGT	350		
PF2-2.14.3H.DNA	CTCCTCAG		338	
VIV-4/4.35	-----		294	
Consenso	CTCCTCAG		358	

FIG. 2B

F0016728

6/25

6.1.1H	GAGGTGCAGC TGTTGGACTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC	50
4.9.2H	GAGGTGCAGC TGTTGGACTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC	50
DP47	GAGGTGCAGC TGTTGGACTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC	50
2.13.2H	GAGGTGCAGC TGTTGGACTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC	50
Consenso	GAGGTGCAGC TGTTGGACTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC	50
	CDR1	
6.1.1H	CCTGAGACTC TCCTGTACAG CCTCTGGATT CACCTTTAGC AGCTATGCCA	100
4.9.2H	CCTGAGACTC TCCTGTACAG CCTCTGGATT CACCTTTAGC AGCTATGCCA	100
DP47	CCTGAGACTC TCCTGTACAG CCTCTGGATT CACCTTTAGC AGCTATGCCA	100
2.13.2H	CCTGAGACTC TCCTGTACAG CCTCTGGATT CACCTTTAGC AGCTATGCCA	100
Consenso	CCTGAGACTC TCCTGTACAG CCTCTGGATT CACCTTTAGC AGCTATGCCA	100
	CDR1	
6.1.1H	TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAAGG GGCTGGACTG GGTCTCAGGT	150
4.9.2H	TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAAGG GGCTGGACTG GGTCTCAGGT	150
DP47	TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAAGG GGCTGGACTG GGTCTCAGGT	150
2.13.2H	TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAAGG GGCTGGACTG GGTCTCAGGT	150
Consenso	TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAAGG GGCTGGACTG GGTCTCAGGT	150
	CDR2	
6.1.1H	ATTACTGGCA GTGGTGGTAG TACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG	200
4.9.2H	ATTAGTGGTA GTGGTGGTAT CACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG	200
DP47	ATTAGTGGTA GTGGTGGTAC CACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG	200
2.13.2H	ATTAGTGGTA GTGGTGGTAC CACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG	200
Consenso	ATTAGTGGTA GTGGTGGTAC YACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG	200
	CDR2	
6.1.1H	GTTACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA	250
4.9.2H	GTTACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA	250
DP47	GTTACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAATGA	250
2.13.2H	GTTACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAC CACGCTGTAT CTGCAAATGA	250
Consenso	GTTACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAC CACGCTGTAT CTGCAAATGA	250
	CDR3	
6.1.1H	ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GAAAGATC--	298
4.9.2H	ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GAAAGATCTG	300
DP47	ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GAAAGA---	296
2.13.2H	ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GAAAGATCTT	300
Consenso	ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GAAAGATCTK	300
	CDR3-for 4.9.2 and 2.13.2	
6.1.1H	----- ----- ----- -C- 299	
4.9.2H	GGCTACGGTG ACTTTTACTA CTACTACTAC GGTATGGACG TCTGGGGCCA	350
DP47	----- ----- ----- 296	
2.13.2H	GGCTGGTCG ACTCTTACTA CTACTACTAC GGTATGGACG TCTGGGGCCA	350
Consenso	GGCTRSKSYG ACTYTTACTA CTACTACTAC GGTATGGACG TCTGGGGCCA	350
	CDR3-for 6.1.1	
6.1.1H	AGGGACTACG GTGATTATGA GTTGGTTCGA CCCCTGGGGC CAGGGAACCC	349
4.9.2H	AGGGACCAC- ----- ----- ----- 359	
DP47	----- ----- ----- 296	
2.13.2H	AGGGACCAC- ----- ----- ----- 359	
Consenso	AGGGACYACG GTGATTATGA GTTGGTTCGA CCCCTGGGGC CAGGGAACCC	400

FIG. 2C-1

PLATINUM

7/25

6.1.1H	TGGTCACCGT	CTCCTCAG	367
4.9.2H	-GGTCACCGT	CTCCTCAG	376
DP47	-----	-----	296
2.13.2H	-GGTCACCGT	CTCCTCAG	376
Consenso	TGGTCACCGT	CTCCTCAG	418

FIG. 2C-2

4.17.3H	-----	CCCAGGA CTGGTGAAGC CTTCGGAGAC	27
DP71	CAGGTGCAGC	TGCAGGGAGTC GGGCCCCAGGA CTGGTGAAGC CTTCGGAGAC	50
Consenso	CAGGTGCAGC	TGCAGGGAGTC GGGCCCCAGGA CTGGTGAAGC CTTCGGAGAC	50
		CDR1	
4.17.3H	CCTGTCCCTC	ACCTGCACTG TCTCTGGTGG CTCCATCAGT AGTTACTACT	77
DP71	CCTGTCCCTC	ACCTGCACTG TCTCTGGTGG CTCCATCAGT AGTTACTACT	100
Consenso	CCTGTCCCTC	ACCTGCACTG TCTCTGGTGG CTCCATCAGT AGTTACTACT	100
	CDR1		
4.17.3H	GGAGCTGGAT	CCGGCAGCCC CCAGGGAAGG GACTGGAGTG GATTGGGTAT	127
DP71	GGAGCTGGAT	CCGGCAGCCC CCAGGGAAGG GACTGGAGTG GATTGGGTAT	150
Consenso	GGAGCTGGAT	CCGGCAGCCC CCAGGGAAGG GACTGGAGTG GATTGGGTAT	150
	CDR2		
4.17.3H	ATCTATTACA	GTGGGAGCAC CAACTACAAC CCCTCCCTCA AGAGTCGAGT	177
DP71	ATCTATTACA	GTGGGAGCAC CAACTACAAC CCCTCCCTCA AGAGTCGAGT	200
Consenso	ATCTATTACA	GTGGGAGCAC CAACTACAAC CCCTCCCTCA AGAGTCGAGT	200
4.17.3H	CACCATATCA	GTAGACACGT CCAAGAACCA GTTCTCCCTG AAGCTGAGT	227
DP71	CACCATATCA	GTAGACACGT CCAAGAACCA GTTCTCCCTG AAGCTGAGT	250
Consenso	CACCATATCA	GTAGACACGT CCAAGAACCA GTTCTCCCTG AAGCTGAGT	250
	CDR3		
4.17.3H	CTGTGACCGC	TGCCGACACG GCCGTGTATT ACTGTGCCAG GACGTATAGC	277
DP71	CTGTGACCGC	TGCCGACACG GCCGTGTATT ACTGTGCGA GA-----	289
Consenso	CTGTGACCGC	TGCCGACACG GCCGTGTATT ACTGTGCCAG GACGTATAGC	300
4.17.3H	AGTTCGTTCT	ACTACTACGG TATGGACGTC TGGGGCCAAG GGACCACGGT	327
DP71	-----	GA----- GA-----	293
Consenso	AGTTCGTTCT	ACTACTACGG TATGGACGTC TGGGGCCAAG GGACCACGGT	350
4.17.3H	CACCGTCTCC	TCAG	341
DP71	-----	-----	293
Consenso	CACCGTCTCC	TCAG	364

FIG. 2D

170

P10116726

8/25

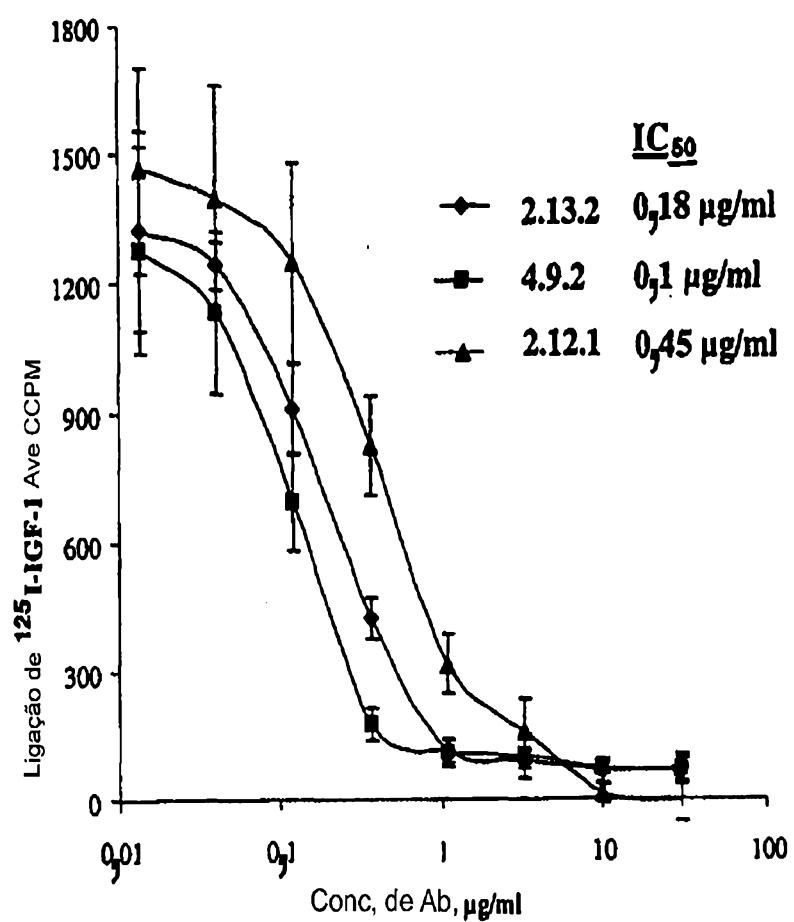


FIG. 3

171

P10116726

9/25

Estim. IGF 1 Agenda - + + + + + + + + + 24

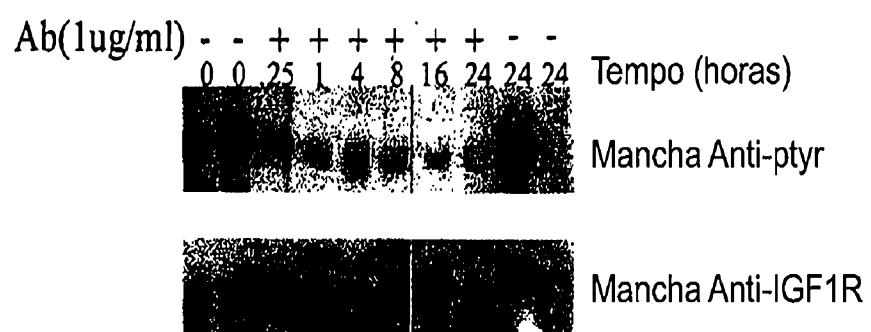


FIG. 4

172

P10116723

10/25

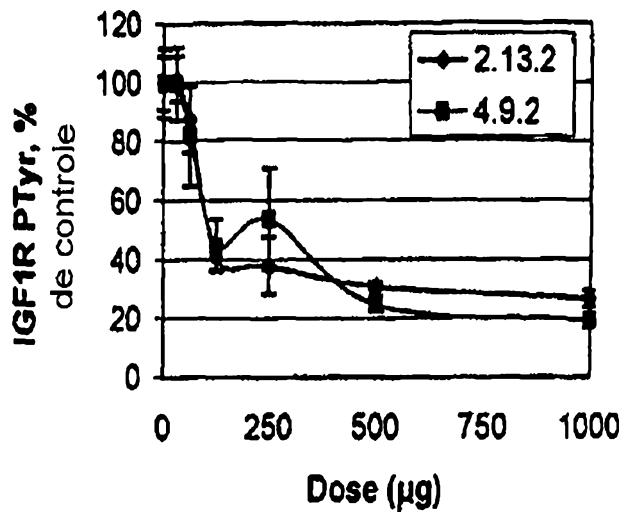


FIG. 5

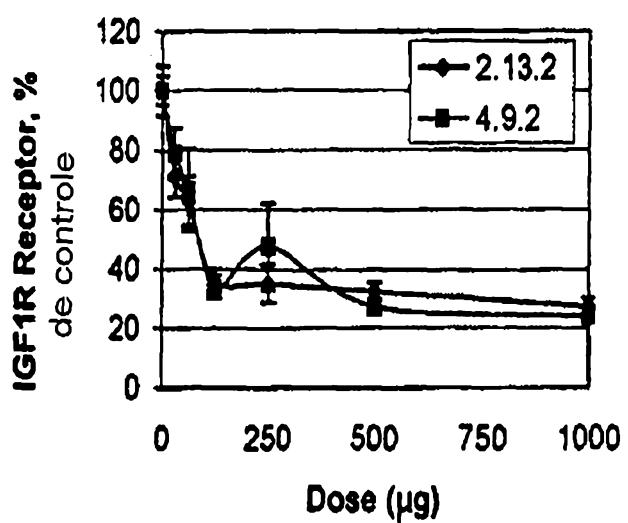


FIG. 6

P10116728

11/25

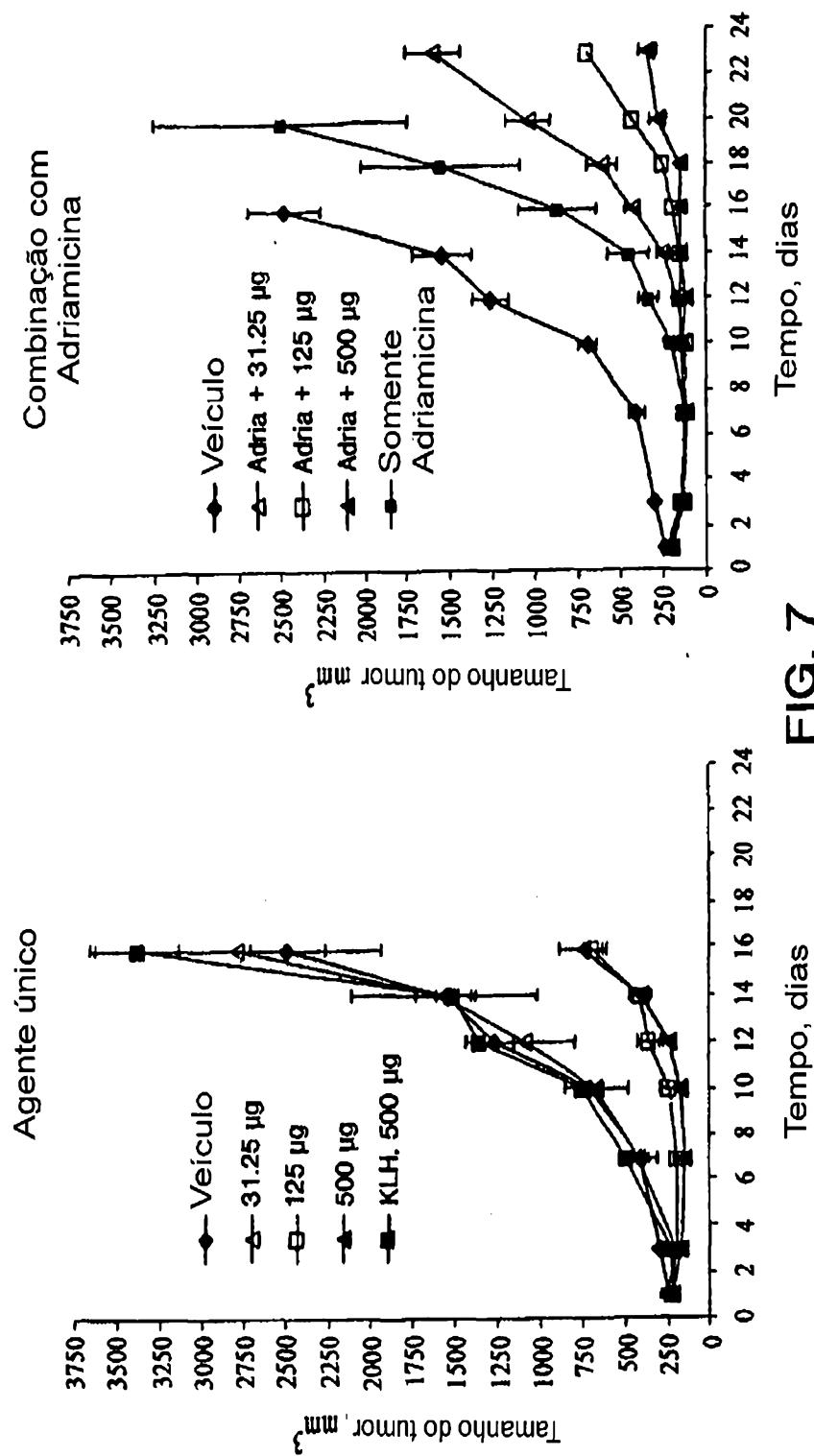


FIG. 7

174

P10116726

12/25

Tratamento: dose de 125 µg

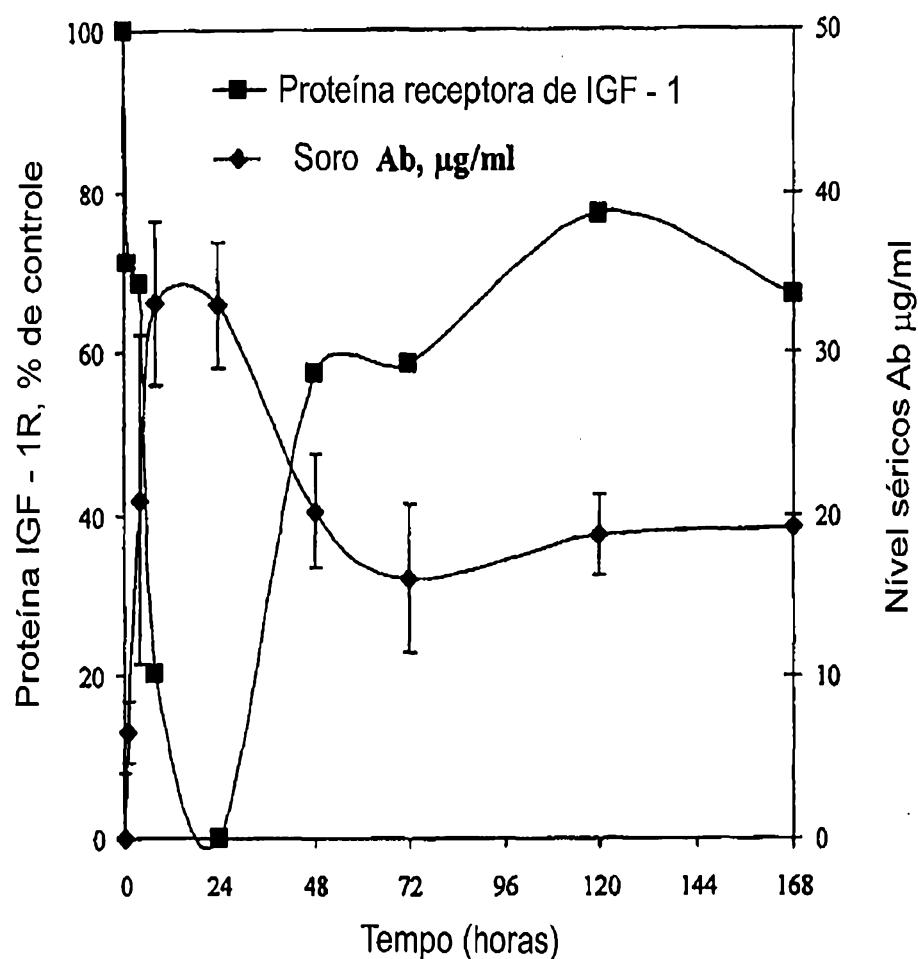


FIG. 8

P10116726

13/25

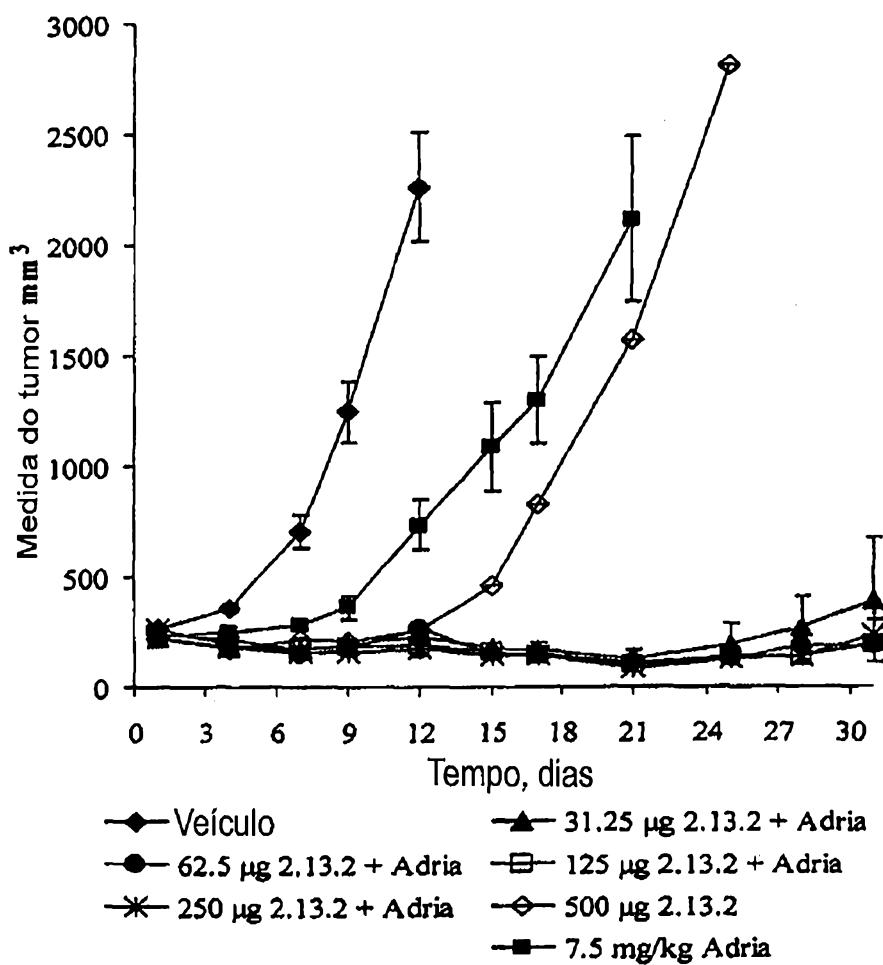


FIG. 9

P10116726

14/25

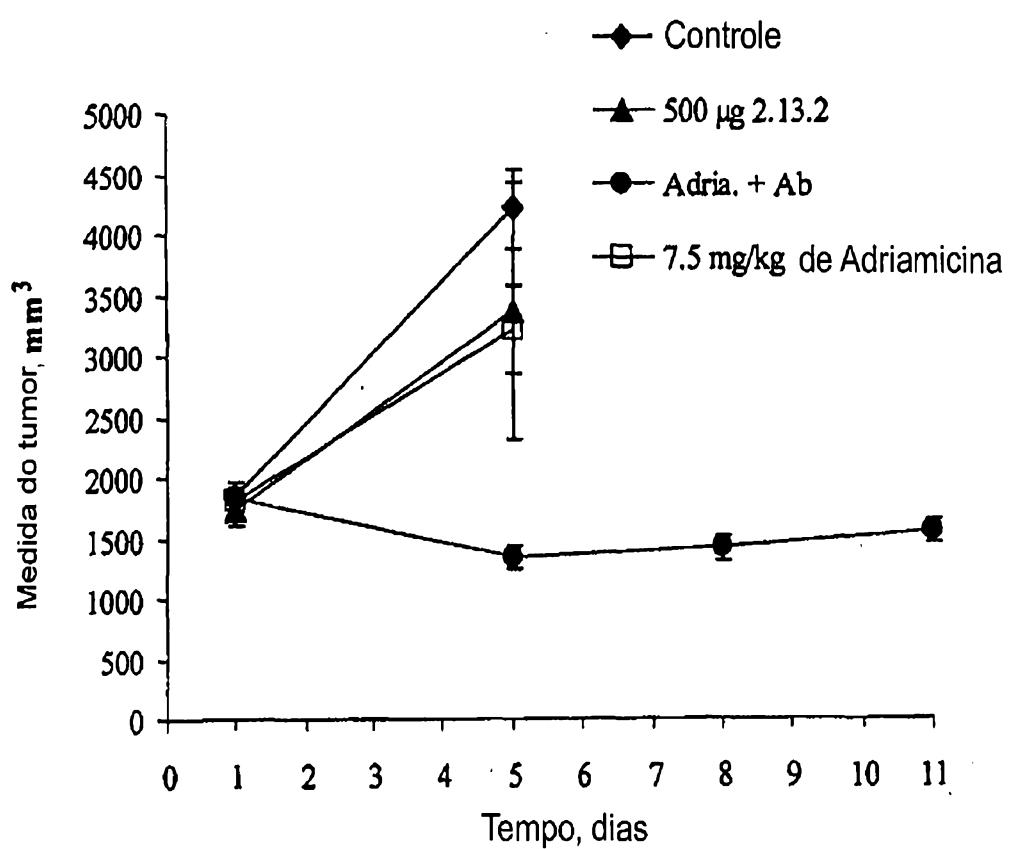


FIG. 10

P10116726

15/25

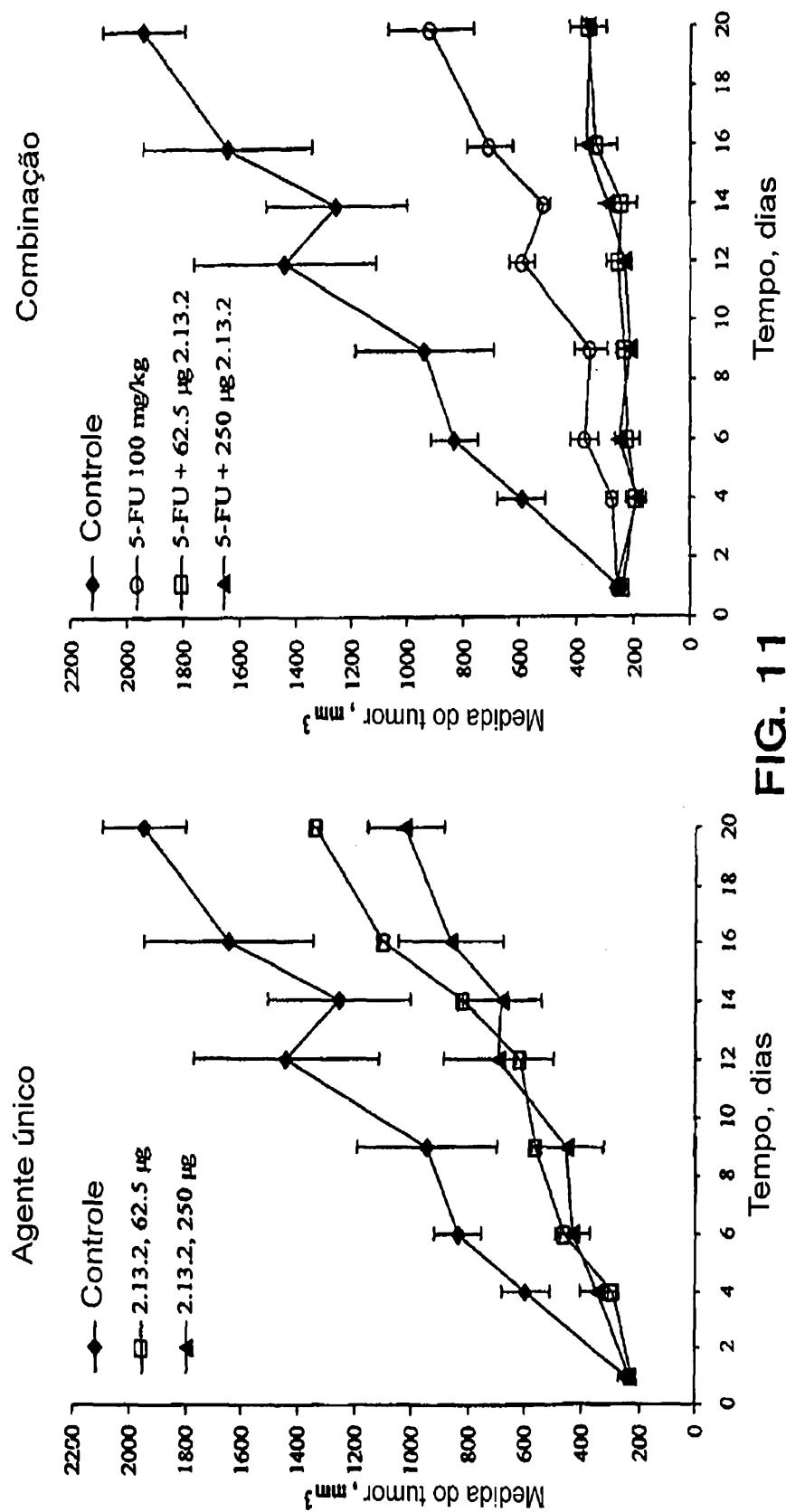


FIG. 11

FIGURAS

16/25

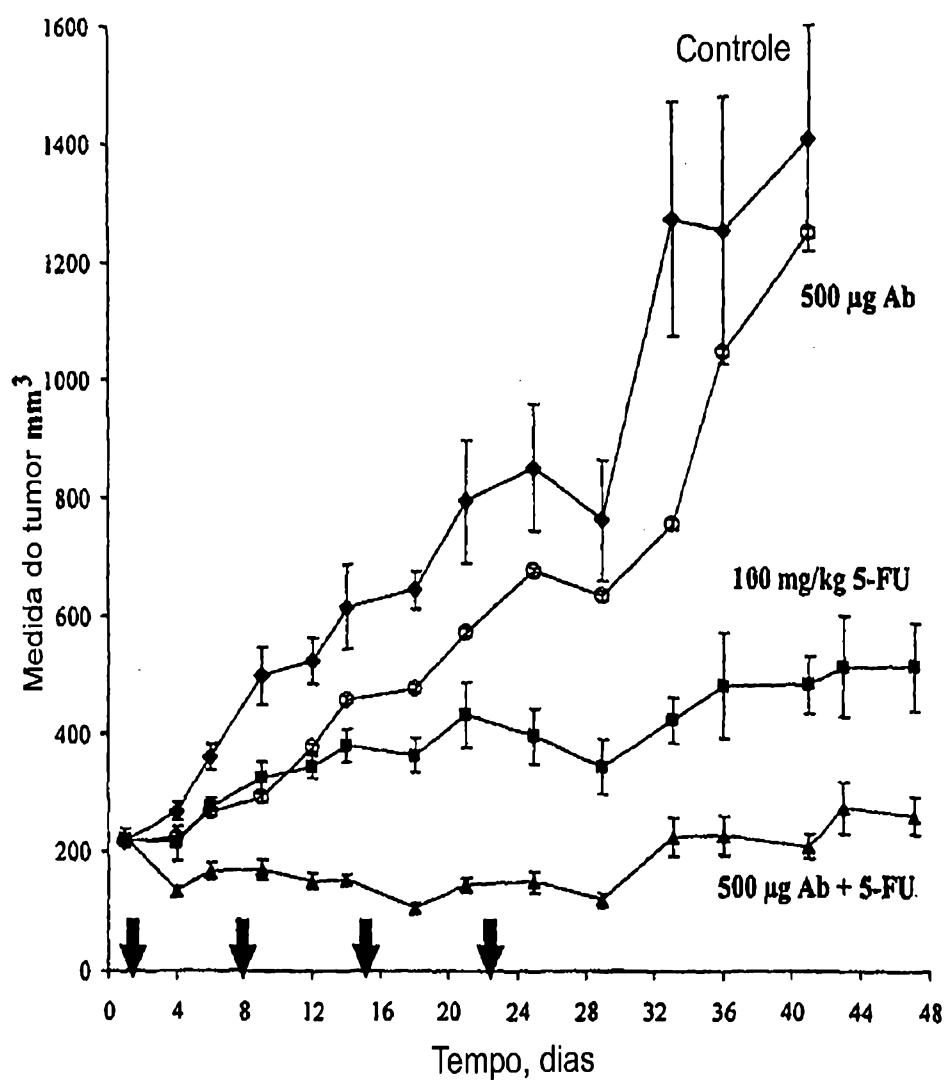


FIG. 12

P10116728

17/25

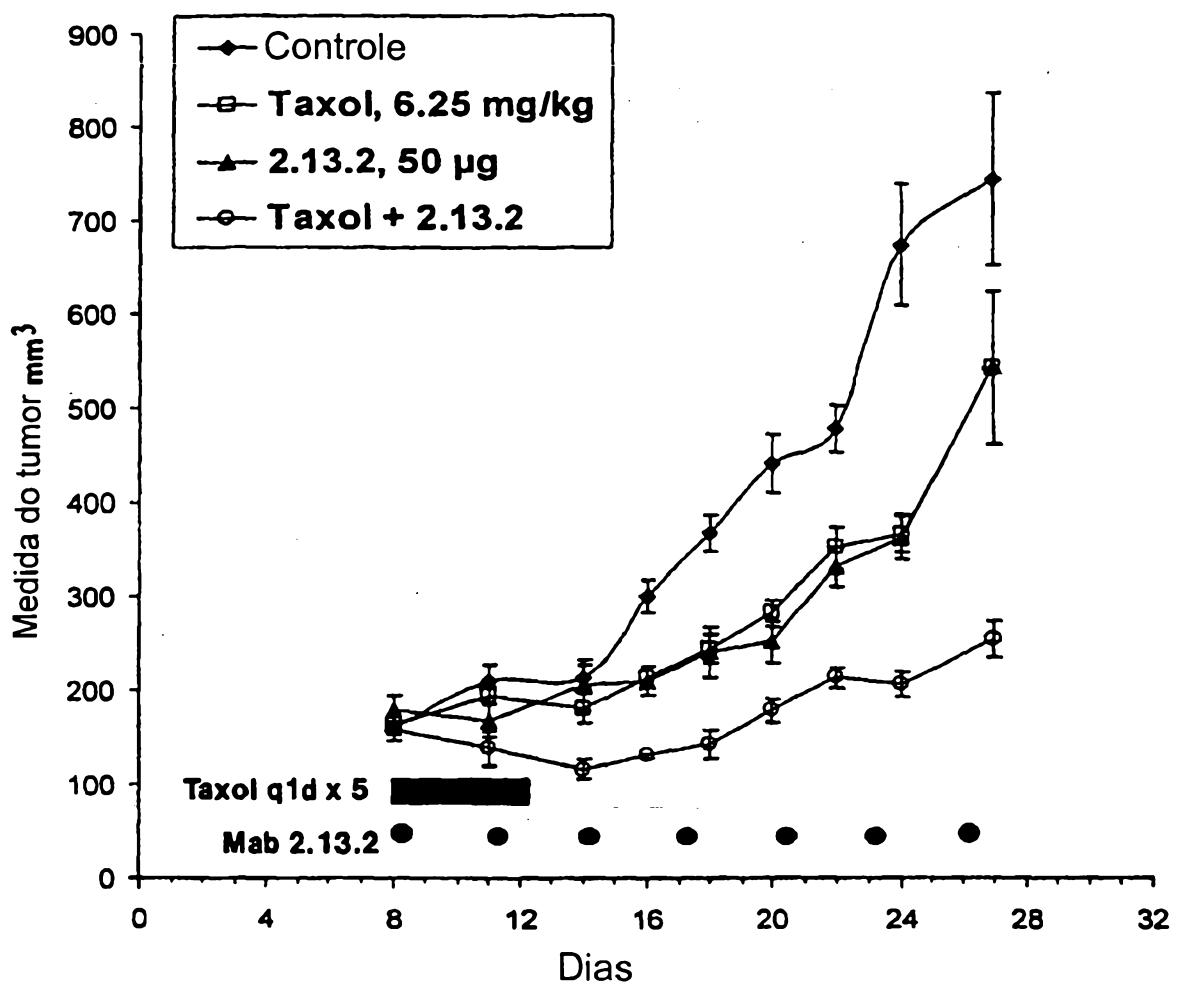


FIG. 13

F10116726

18/25

Agente único
Combinacão

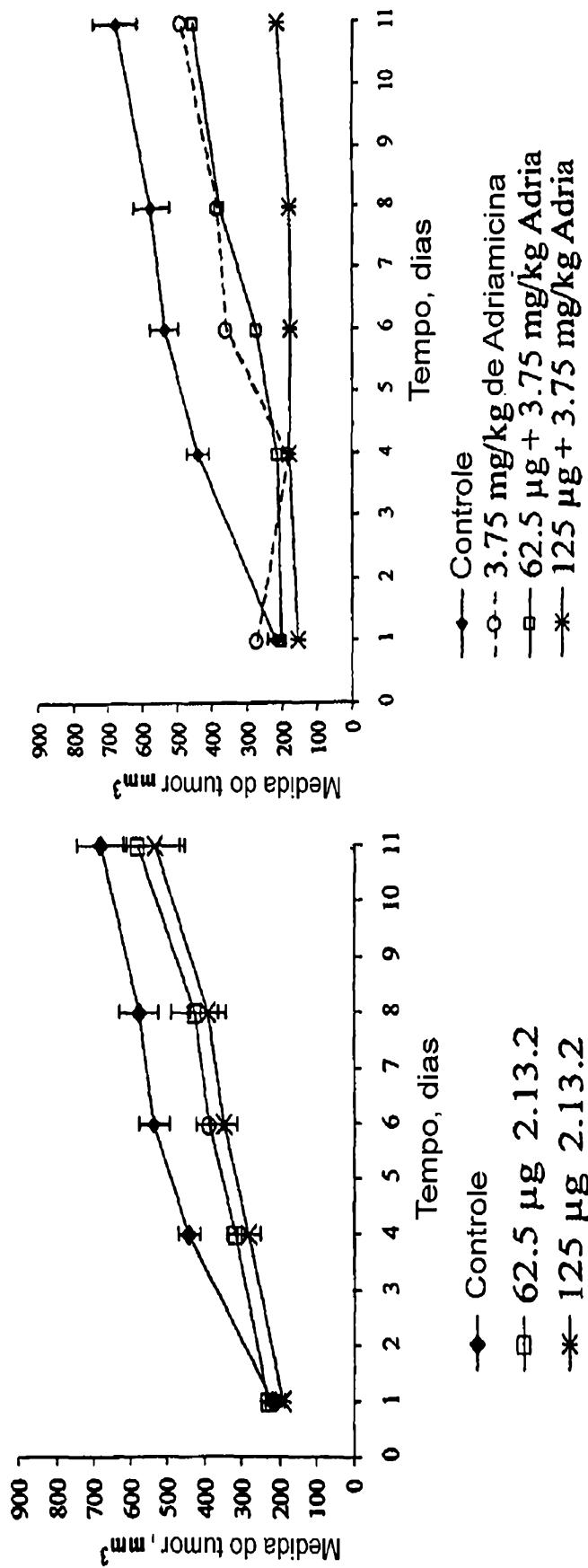


FIG. 14

181
P10116728

19/25

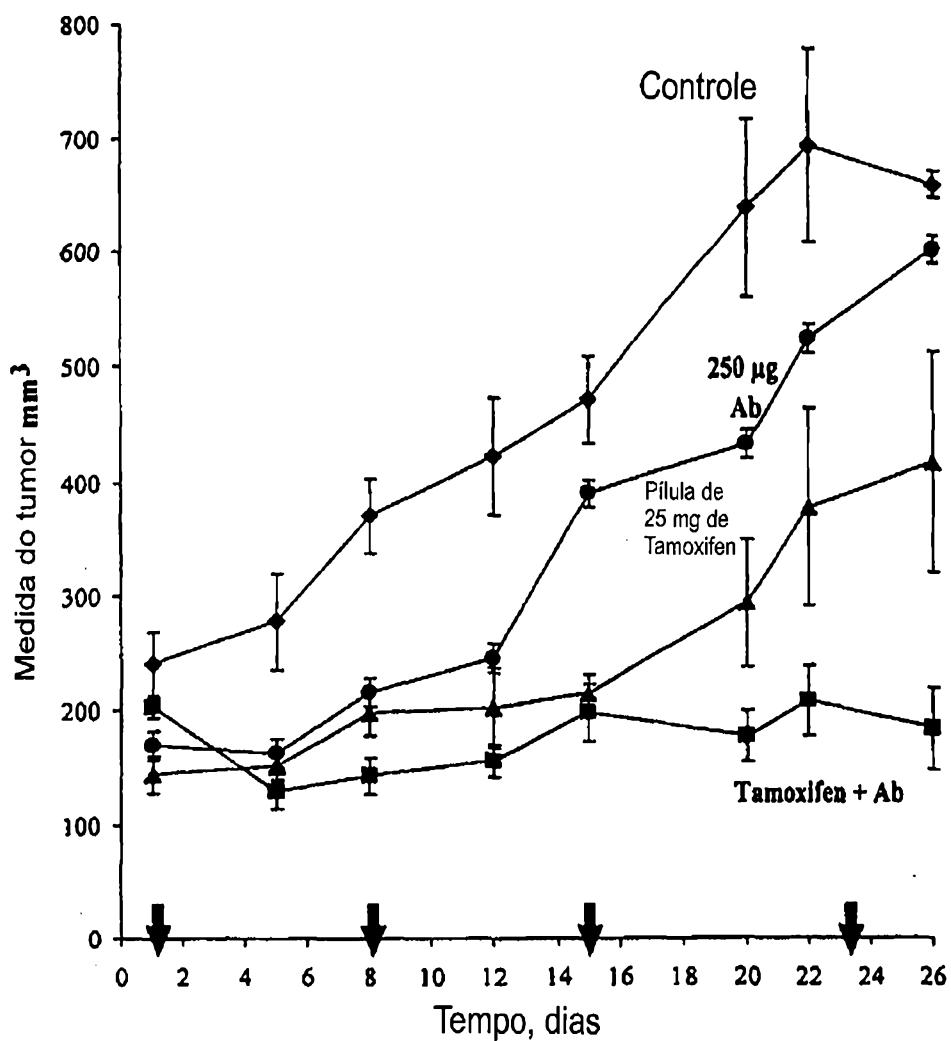


FIG. 15

P10116728

20/25

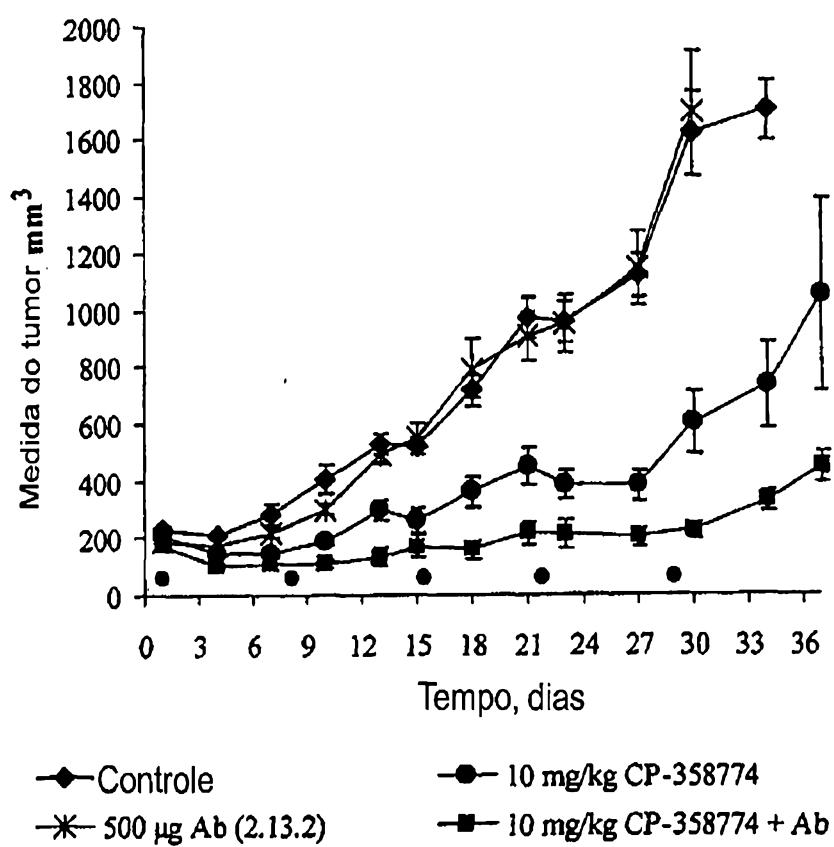


FIG. 16

P10116728

21/25

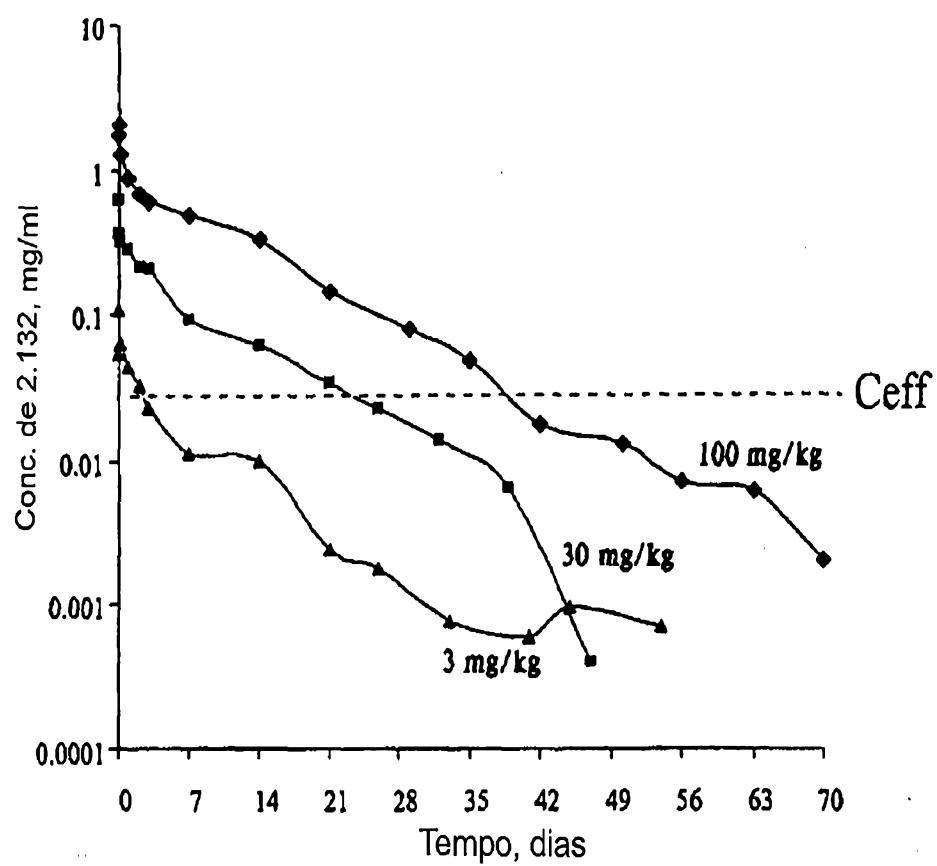


FIG. 17

P10116728

22/25

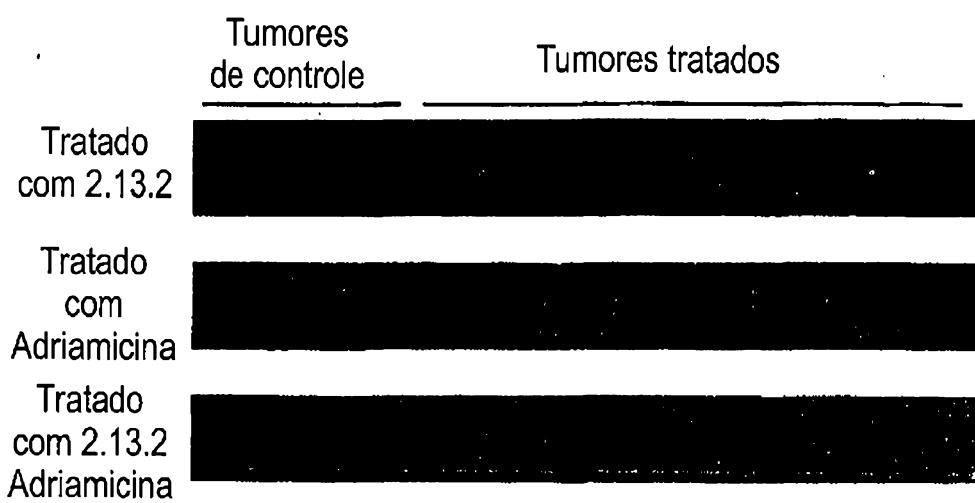


FIG. 18

P10116728

23/25

Clone	Pesada	Mutações de domínios C	Mutação FR	Mutação CDR	Alteração em Cys	Alteração na glicosilação
2.13.2	Leve	0	3	8	0	0
2.13.2	Leve	0	1	4	1 (CDR3)	0
2.12.2	Pesada	0	2	8	0	0
2.12.2	Leve	0	3	5	0	0

FIG. 19A

FIG. 19B

210116728

24/25

PF2 2.13.2 LC (A30/JR2) + * * * * *
 NDARVPAQLL GILLLMPPCA RCDIQATQFP SLSASAVGDR VITICRASQG IRNDLGMYQQ KPGKAPKRLL YASRLHKGV PSRFSGSQG TEPFTLTISSL
 NDARVPAQLL GILLLMPPCA RCDIQATQSP SLSASAVGDR VITICRASQG IRNDLGMYQQ KPGKAPKRLL YASSLQSGV PSRFSGSQG TEPFTLTISSL
 * * * * *
 QPEDFATTYC LOENSYPCSF CGCTKLEIIR TVAAPSVIF PPSDBQLKSG TAVVCLANN FPREAKVQN KVDNALQSGN SOESVTQDS KDSFTSLSST
 QPEDFATTYC LOENSYPCSF CGCTKLEIIR TVAAPSVIF PPSDBQLKSG TAVVCLANN FPREAKVQN KVDNALQSGN SOESVTQDS KDSFTSLSST
 LTLSKADYEK HKVYACBVTK QGLSSPUTKS FNRGEC
 LTLSKADYEK HKVYACBVTK QGLSSPUTKS FNRGEC

FIG. 19C

PF2 2.12.1 cadeia pesada (DP-35 (3-11)/D3-3/JH6)

* * * * *
 NEFGLSWVPL VALIKGVQCC AQLVEGGGL VXPGGSLRLS CAASGFTFSD YTMWSIROAP GKGLMWSXI SSSGSTRDYA DSVWGRFTIS RDNAKNSXL
 NEFGLSWVPL VALIKGVQCC VQLVEGGGL VXPGGSLRLS CAASGFTFSD YTMWSIROAP GKGLMWSXI SSSGSTRDYA DSVWGRFTIS RDNAKNSXL
 * * * * *
 QNSLRARDT AVYXCARVLL FLEMXXXX XYGMDVNGQ TTYTVSSAST KGPSVFLAP CSRSTSESTA ALGCLVXKDYP PEPVTVSMNS GALTSGVHTP
 QNSLRARDT AVYXCARVLL FLEMXXXX XYGMDVNGQ TTYTVSSAST KGPSVFLAP CSRSTSESTA ALGCLVXKDYP PEPVTVSMNS GALTSGVHTP
 PAVLQSSGLY SLSSVUTVPS SNFGTQTYTC NVDHKPSNTK VDKTVERKCC VECPPCPAPP VAGPSVPLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ
 PAVLQSSGLY SLSSVUTVPS SNFGTQTYTC NVDHKPSNTK VDKTVERKCC VECPPCPAPP VAGPSVPLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ
 FNWYUDGVEV HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTIVHODWL NGKEYKCKVS NKGLPAPIEK TISKTKGQPRE PQVYTLPSS REEMTKNOVS LTCLVKGFYP
 FNWYUDGVEV HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTIVHODWL NGKEYKCKVS NKGLPAPIEK TISKTKGQPRE PQVYTLPSS REEMTKNOVS LTCLVKGFYP
 SDIAVEWESN GOPENNYKTT PPMLDSDGSE FLYSKLTVDK SRWQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLSP GK
 SDIAVEWESN GOPENNYKTT PPMLDSDGSE FLYSKLTVDK SRWQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLSP GK

FIG. 19D

F 0016728

25/25

PF2.12.1 cadeia pesada (A30/Jk1)

MDNKVPAGLL	GILLLNFPGA	RCDIQMTQSP	SSLSASVGDR	+ * * * *	KPGKAPKRLI	YASRRLQSGV	PSRFSGSGSG	TEPTLTISSL
MDNRVPAGLL	GILLLNFPGA	RCDIQMTQSP	SSLSASVGDR	VITTCRASQD	IRRDLGWYQQ	KPGKAPKRLI	PSRFSGSGSG	TEPTLTISL
*	*	*	*	VITTCRASQD	IRNDLGWYQQ	KPGKAPKRLI	YASSLQSGV	PSRFSGSGSG
QPEDPATYC	QHINNTPTTY	TVAAPSVPIF	PPSDEQLKSG	TASVVCILNN	FYREAKVQW	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYSLSST
QPEDPATYC	QHEESTPMTF	TVAAPSVPIF	PPSDEQLKSG	TASVVCILNN	FYREAKVQW	KVDNALQSGN	SQESVTEQDS	KDSTYSLSST
LTLISKADYEK	HKVYACEVTH	QGLSSPVTKS	FNRGEC					
LTLISKADYEK	HKVYACEVTH	QGLSSPVTKS	FNRGEC					

FIG. 19E