



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 317 020**

51 Int. Cl.:

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 5/16 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04763146 .0**

96 Fecha de presentación : **09.07.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1646720**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.04.2006**

54 Título: **Anticuerpos frente al receptor del factor de crecimiento similar a la insulina I y la utilización de los mismos.**

30 Prioridad: **10.07.2003 EP 03015526**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

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

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

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos frente al receptor del factor de crecimiento similar a la insulina I y la utilización de los mismos.

5 La presente invención está relacionada con anticuerpos dirigidos frente al receptor del factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-IR), métodos para su producción, composiciones farmacéuticas que contienen dichos anticuerpos, y la utilización de los mismos.

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

15 Los anticuerpos frente a IGF-IR son bien conocidos en el estado de la técnica y son investigados por sus efectos antitumorales *in vitro* e *in vivo* (Benini, S., *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 1790-1797; Scotlandi, K., *et al.*, *Cancer Gene Ther.* 9 (2002) 296-307; Scotlandi, K., *et al.*, *Int. J. Cancer* 101 (2002) 11-16; Brunetti, A., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165 (1989) 212-218; Prigent, S.A., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 9970-9977; Li, S.L., *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 49 (2000) 243-252; Pessino, A., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162 (1989) 1236-1243; Surinya, K.H., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 16718-16725; Soos, M.A., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 12955-12963; Soos, M.A., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 5217-5221; O'Brien, R.M., *et al.*, *EMBO J.* 6 (1987) 4003-4010; Taylor, R., *et al.*, *Biochem. J.* 242 (1987) 123-129; Soos, M.A., *et al.*, *Biochem. J.* 235 (1986) 199-208; Li, S.L., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196 (1993) 92-98; Delafontaine, P., *et al.*, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 26 (1994) 1659-1673; Kull, F.C. Jr., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 6561-6566; Morgan, D.O., y Roth, R.A., *Biochemistry* 25 (1986) 1364-1371; Forsayeth, J.R., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 3448-3451; Schaefer, E.M., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 13248-13253; Gustafson, T.A., y Rutter, W.J., *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 18663-18667; Hoyne, P.A., *et al.*, *FEBS Lett.* 469 (2000) 57-60; Tulloch, P.A., *et al.*, *J. Struct. Biol.* 125 (1999) 11-18; Rohlik, Q.T., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149 (1987) 276-281; y Kalebic, T., *et al.*, *Cancer Res.* 54 (1994) 5531-5534; Adams, T. E., *et al.*, *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1050-1063; Dricu, A., *et al.*, *Glycobiology* 9 (1999) 571-579; Kanter-Lewensohn, L., *et al.*, *Melanoma Res.* 8 (1998) 389-397; Li, S.L., *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 49 (2000) 243-252). Los anticuerpos frente a IGF-IR también se describen en gran cantidad de publicaciones adicionales, por ejemplo, Arteaga, C.L., *et al.*, *Breast Cancer Res. Treatment* 22 (1992) 101-106; y Hailey, J., *et al.*, *Mol. Cancer Ther.* 1 (2002) 1349-1353.

20 En particular, el anticuerpo monoclonal frente a IGF-IR denominado α IR3 se utiliza ampliamente en la investigación para el estudio de los procesos mediados por IGF-IR y las enfermedades mediadas por IGF-I como el cáncer. El alfa-IR-3 se describe en Kull, F.C., *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 6561-6566. Mientras tanto, se han publicado alrededor de cien publicaciones relacionadas con la investigación y uso terapéutico de α IR3 en relación a su efecto antitumoral, sólo y junto con agentes citostáticos como la doxorubicina y la vincristina. El α IR3 es un anticuerpo monoclonal murino que se conoce porque inhibe la unión de IGF-I al receptor de IGF pero no inhibe la unión de IGF-II al IGF-IR. El α IR3 estimula a altas concentraciones la proliferación de células tumorales y la fosforilación de IGF-IR (Bergmann, U., *et al.*, *Cancer Res.* 55 (1995) 2007-2011; Kato, H., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 2655-2661). Existen otros anticuerpos (por ejemplo, el 1H7, Li, S.L., *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 49 (2000) 243-252) que inhibe la unión de IGF-II a IGF-IR de forma más potente que la unión al IGF-I. Un resumen del estado de la técnica de los anticuerpos y sus propiedades y características se describe en Adams, T.E., *et al.*, *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1050-1063.

25 La mayoría de los anticuerpos descritos en el estado de la técnica son de origen murino. Tales anticuerpos no son, tal como se conoce en el estado de la técnica, útiles para la terapia de pacientes humanos sin alteraciones adicionales como la quimerización o la humanización. En base a estas desventajas, los anticuerpos humanos son preferibles como agentes terapéuticos en el tratamiento de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos son bien conocidos en el estado de la técnica (van Dijk, M.A., y van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Pharmacol.* 5 (2001) 368-374). En base a esta tecnología, pueden producirse anticuerpos humanos frente a una gran variedad de dianas. Ejemplos de anticuerpos humanos frente a IGF-IR se describen en WO 02/053596.

30 No obstante, existe todavía una necesidad de anticuerpos frente a IGF-IR con beneficios concluyentes para pacientes que necesitan una terapia antitumoral. El beneficio relevante para el paciente es, en términos sencillos, una reducción en el crecimiento tumoral y una prolongación significativa del tiempo de progresión provocado por el tratamiento con el agente antitumorigénico.

Resumen de la invención

35 La invención comprende un anticuerpo que se une a IGF-IR e inhibe la unión de IGF-I e IGF-II al IGF-IR, que se caracteriza en que dicho anticuerpo

a) es del isotipo IgG1,

b) muestra una proporción de valores CI_{50} de inhibición de la unión de IGF-I al IGF-IR respecto a la inhibición de la unión de IGF-II al IGF-IR, de 1:3 a 3:1,

c) inhibe en al menos un 80%, preferiblemente en al menos un 90%, a una concentración de 5 nM, la fosforilación de IGF-IR en un ensayo de fosforilación celular utilizando células HT29 en un medio que contiene suero fetal bovino (FCS) al 0,5% inactivado por calor, cuando se compara con un ensayo sin dicho anticuerpo, y

d) no muestra actividad estimuladora de IGF-IR medida como fosforilación de PKB a una concentración de 10 μ M en un ensayo de fosforilación celular utilizando células 3T3 que proporcionan de 400.000 a 600.000 moléculas de IGF-IR por células en un medio que contiene suero fetal bovino (FCS) al 0,5% inactivado por calor, cuando se compara con un ensayo sin dicho anticuerpo.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención muestran beneficios para pacientes que necesitan de una terapia antitumoral y proporcionan una reducción en el crecimiento tumoral y una prolongación significativa del tiempo de progresión. Los anticuerpos de acuerdo con la invención poseen propiedades nuevas e innovadoras que provocan un beneficio para un paciente que padece una enfermedad asociada con una desregulación de IGF, especialmente una enfermedad tumoral. Los anticuerpos de acuerdo con la invención se caracterizan por las propiedades mencionadas anteriormente. Las propiedades son por lo tanto específicas de la unión a IGF-IR, de la inhibición de la unión de IGF-I e IGF-II a IGF-IR en la proporción anteriormente mencionada, siendo del isotipo IgG1, y que no active la señalización de IGF-IR aún en células que sobreexpresen IGF-IR a una concentración 200 veces superior a la de su valor de CI_{50} . Los anticuerpos que no poseen "actividad mimética de IGF-I" proporcionan una gran ventaja cuando se utilizan como agentes terapéuticos.

Preferiblemente, un anticuerpo de acuerdo con la invención induce de forma adicional la muerte celular del 20% de las células o más, en una preparación de células que expresan IGF-IR tras 24 horas a una concentración de dicho anticuerpo de 100 nM mediante ADCC.

Preferiblemente, y de forma adicional, los anticuerpos de acuerdo con la invención inducen la muerte celular del 20% de las células o más, en una preparación de células que expresan IGF-IR tras 4 h a una concentración de dicho anticuerpo de 100 nM mediante CDC.

Preferiblemente, a una concentración de 5 nM, los anticuerpos de acuerdo con la invención inhiben completamente la transducción de señales del IGF-IR mediadas por IGF-I en las células tumorales.

La invención también comprende ácidos nucleicos. Los polipéptidos codificados son capaces de ensamblarse junto con las correspondientes cadenas de anticuerpo definidas a continuación:

a) una cadena pesada de anticuerpo que comprende los CDR, CDR1 (aa 31-35), CDR2 (aa 50-66) y CDR3 (aa 99-107) del Id. de Sec. N° 1 o 3;

b) una cadena ligera de anticuerpo que comprende los CDR, CDR1 (aa 24-34), CDR2 (aa 50-56) y CDR3 (aa 89-98) del Id. de Sec. N° 2 o 4.

El anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo monoclonal y, además, un anticuerpo quimérico (cadena constante humana), un anticuerpo humanizado y especialmente preferible un anticuerpo humano.

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

El anticuerpo se caracteriza además por una afinidad de 10^{-8} M (K_D) o menos, preferiblemente de alrededor de 10^{-9} a 10^{-13} M.

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

Preferiblemente, la invención proporciona anticuerpos que comprenden regiones determinantes de la complementariedad (CDR) con las siguientes secuencias:

a) una cadena pesada de anticuerpo que comprende los CDR, CDR1 (aa 31-35), CDR2 (aa 50-66) y CDR3 (aa 99-107) del Id. de Sec. N° 1 o 3;

b) una cadena ligera de anticuerpo que comprende los CDR, CDR1 (aa 24-34), CDR2 (aa 50-56) y CDR3 (aa 89-98) del Id. de Sec. N° 2 o 4.

El anticuerpo es preferiblemente del tipo IgG1 y proporciona por lo tanto unión del complemento C1q e induce CDC. El anticuerpo se caracteriza además por la capacidad de unirse al receptor IgGfC y de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

El anticuerpo de acuerdo con la invención prolonga de forma considerable el tiempo de progresión en modelos tumorales de xenoinjertos relevantes en comparación con los animales tratados con vehículo y reduce el crecimiento tumoral. El anticuerpo inhibe la unión del IGF-I e IGF-II al IGF-IR *in vitro* e *in vivo*, preferiblemente en la misma forma para IGF-I e IGF-II.

La invención proporciona además líneas celulares de hibridoma que producen dichos anticuerpos monoclonales antagonistas de acuerdo con la invención.

Las líneas celulares preferibles de hibridoma de acuerdo con invención, <IGF-1R> HUMAB Clon 18 (anticuerpo 18) y <IGF-1R> HUMAB Clon 22 (anticuerpo 22), se depositaron en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Alemania.

Línea celular	N° de depósito	Fecha de depósito
<IGF-1R> HUMAB-Clon 18	DSM ACC 2587	10-04-2003
<IGF-1R> HUMAB-Clon 22	DSM ACC 2594	09-05-2003

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

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

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

La invención proporciona además métodos para tratar el cáncer, que comprende la administración a un paciente diagnosticado con cáncer (y por lo tanto en necesidad de una terapia antitumoral) una cantidad efectiva de un anticuerpo antagonista frente a IGF-IR de acuerdo con la invención. El anticuerpo puede administrarse solo, en una composición farmacéutica, o alternativamente en combinación con un tratamiento citotóxico como radioterapia o un agente citotóxico o un profármaco del mismo.

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

La invención comprende además una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo de acuerdo con la invención con una cantidad farmacéuticamente efectiva, opcionalmente junto con un tampón y/o un adyuvante útil para la formulación de anticuerpos para propósitos farmacéuticos.

La invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden tales anticuerpos en un transportador farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica puede incluirse en un artículo de fabricación o equipo.

La invención comprende además un vector que contiene un ácido nucleico de acuerdo con la invención, capaz de expresar dicho ácido nucleico en una célula huésped procariota o eucariota.

La invención comprende además una célula huésped procariota o eucariota que comprende un vector de acuerdo con la invención.

La invención comprende además un método para la producción de un anticuerpo recombinante humano de acuerdo con la invención, que se caracteriza porque expresa un ácido nucleico de acuerdo con la invención en una célula huésped procariota o eucariota y la recuperación de dicho anticuerpo de dicha célula huésped. La invención comprende además el anticuerpo obtenible mediante dicho método recombinante.

La invención comprende además un método para la selección de un anticuerpo frente a IGF-IR a partir de una diversidad de anticuerpos frente a IGF-IR que se caracteriza en que se realiza un ensayo de fosforilación celular que utiliza células 3T3 que proporcionan de 400.000 a 600.000 moléculas de IGF-IR por célula en un medio que contiene suero fetal bovino (FCS) al 0,5% inactivado por calor con dichos anticuerpos y que selecciona dicho anticuerpo que no muestra actividad estimuladora de IGF-IR medida como fosforilación de PKB a una concentración de 10 μ M cuando se compara con dicho ensayo sin dicho anticuerpo. Preferiblemente el anticuerpo posee una o más de las propiedades adicionales anteriormente mencionadas.

La invención comprende además un método para la preparación de una composición farmacéutica que se caracteriza en seleccionar un anticuerpo frente a IGF-IR a partir de una diversidad de anticuerpos frente a IGF-IR realizando un ensayo de fosforilación celular que utiliza células 3T3 que proporcionan de 400.000 a 600.000 moléculas de IGF-IR por célula en un medio que contiene suero fetal bovino (FCS) al 0,5% inactivado por calor con dichos anticuerpos y que selecciona dicho anticuerpo que no muestra actividad estimuladora de IGF-IR medida como fosforilación de PKB a una concentración de 10 μ M cuando se compara con dicho ensayo sin dicho anticuerpo, produciendo dicho anticuerpo mediante expresión recombinante, recuperando dicho anticuerpo y combinando dicho anticuerpo con un tampón farmacéuticamente aceptable y/o adyuvante. Preferiblemente el anticuerpo posee una o más de las propiedades adicionales anteriormente mencionadas.

Descripción detallada de la invención

El término “anticuerpo” abarca las diferentes formas de anticuerpos que incluye pero no se limita a anticuerpos enteros, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos genéticamente modificados siempre que se retengan las propiedades características de acuerdo con la invención.

“Fragmentos de anticuerpo” comprende una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente al menos la porción de unión a antígeno o la región variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluye diácuerpos, moléculas de anticuerpo de cadena única, inmunotoxinas, y anticuerpos multispecíficos formados de fragmentos de anticuerpo. Además, los fragmentos de anticuerpo comprenden polipéptidos de cadena única que poseen las características de una cadena VH, es decir, que son capaces de ensamblarse junto con una cadena VL o con una cadena VL unida a IGF-IR, es decir, que son capaces de ensamblarse junto con una cadena VH a una región de unión a antígeno funcional y proporcionar por lo tanto la propiedad de inhibir la unión de IGF-I e IGF-II al IGF-IR.

“Fragmentos de anticuerpo” también comprende los fragmentos que *per se* no son capaces de proporcionar funciones efectoras (ADCC/CDC) pero proporcionan esta función en una forma de acuerdo con la invención tras combinarse con dominio(s) constante(s) de anticuerpo apropiado(s).

Los términos “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpo monoclonal” tal como se utiliza aquí se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de una composición de aminoácidos única. De acuerdo con esto, el término “anticuerpo monoclonal humano” se refiere a anticuerpos que muestran una especificidad de unión única que posee regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen mediante un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal transgénico no humano, por ejemplo un ratón transgénico, con un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana fusionado a una célula inmortalizada.

El término “anticuerpo quimérico” se refiere a un anticuerpo que comprende una región variable, es decir, una región de unión, de un origen o especie, y al menos una porción de una región constante derivada de un origen o especie diferente, normalmente obtenido mediante técnicas de DNA recombinante. Los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable murina y una región constante humana son especialmente preferibles. Tales anticuerpos quiméricos murino/humano son el producto de expresión de los genes de las inmunoglobulinas que comprenden segmentos de DNA que codifican las regiones variables de la inmunoglobulina murina y segmentos de DNA que codifican las regiones constantes de la inmunoglobulina humana. Otras formas de “anticuerpos quiméricos” abarcadas por la presente invención son aquellas en que la clase o subclase ha sido modificada o cambiada por aquella del anticuerpo original. Tales anticuerpos “quiméricos” también se denominan “anticuerpos de cambio de clase”. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos implica técnicas de DNA recombinante convencional y técnicas de transfección génica, bien conocidas en la técnica actual. Véase, por ejemplo, Morrison, S.L., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; Patentes Estadounidenses N° 5.202.238 y 5.204.244.

El término “anticuerpo humanizado” se refiere a anticuerpos en los que las regiones marco o “regiones determinantes de complementariedad” (CDR) se han modificado para comprender las CDR de una inmunoglobulina de diferente especificidad comparada con la de la inmunoglobulina parental. En una realización preferible, una CDR murina se inserta en una región marco de un anticuerpo humano para preparar el “anticuerpo humanizado”. Véase, por ejemplo, Riechmann, L., *et al.*, Nature 332 (1988) 323-327; y Neuberger, M.S., *et al.*, Nature 314 (1985) 268-270. Las CDR particularmente preferibles corresponden a aquellas que representan las secuencias que reconocen los antígenos mencionados anteriormente para los anticuerpos quiméricos y bifuncionales.

El término “anticuerpo humano”, como se utiliza aquí, pretende incluir anticuerpos con las regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. La cadena pesada variable deriva preferiblemente de la secuencia de línea germinal DP-50 (GenBank LO6618) y la cadena ligera variable deriva preferiblemente de la secuencia de línea germinal L6 (GenBank X01668). Las regiones constantes del anticuerpo son regiones constantes de IgG1 humano. Dichas regiones pueden ser alotípicas y están descritas en, por ejemplo, Johnson, G., y Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218 y en las bases de datos referenciadas en ellos y son útiles ya que retienen las propiedades de inducción de ADCC y preferiblemente de CDC de acuerdo con la invención.

El término “anticuerpo humano recombinante”, tal como se utiliza aquí, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se han preparado, expresado, creado o aislado mediante medios recombinantes, como los anticuerpos aislados a partir de una célula huésped como una célula SP2-0, NS0 o CHO o a partir de un animal (por ejemplo,

un ratón) que es transgénico para los genes de la inmunoglobulina humana o anticuerpos expresados utilizando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen las regiones variables y constantes derivadas de las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana reorganizadas. Los anticuerpos recombinantes humanos de acuerdo con la invención se han sometido a una hipermutación somática *in vivo*. Por lo tanto, las secuencias de aminoácido de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque son derivadas y están relacionadas con las secuencias VH y VL de la línea germinal humana, pueden no aparecer naturalmente en un repertorio de anticuerpos de línea germinal humana *in vivo*.

Tal como se utiliza aquí, “unión” se refiere a la unión de un anticuerpo a un IGF-IR con una afinidad de alrededor de 10^{-13} a 10^{-8} M (K_D), preferiblemente de alrededor de 10^{-13} a 10^{-9} M.

El término “molécula de ácido nucleico”, tal como se utiliza aquí, pretende incluir moléculas de DNA y moléculas de RNA. Una molécula de ácido nucleico puede ser de cadena doble o de cadena sencilla, pero preferiblemente es un DNA de cadena doble.

Los “dominios constantes” no están involucrados directamente en la unión del anticuerpo a un antígeno pero están involucrados en las funciones efectoras (ADCC, unión del complemento, y CDC). El dominio constante de un anticuerpo de acuerdo con la invención es del tipo IgG1. Los dominios constantes humanos que poseen estas características se describen en detalle en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), y por Brüggemann, M., *et al.*, J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361; Love, T.W., *et al.*, Methods Enzymol. 178 (1989) 515-527. Se muestran ejemplos en los Id. de Sec. N° 5 a 8. Otros dominios constantes útiles y preferibles son los dominios constantes de los anticuerpos obtenibles a partir de las líneas celulares de hibridoma depositadas con DSMZ para esta invención. Los dominios constantes útiles en la invención proporcionan unión al complemento. Se proporcionan ADCC y opcionalmente CDC mediante la combinación de dominios variables y constantes.

La “región variable” (región variable de una cadena ligera (VL), región variable de una cadena pesada (VH)) tal como se utiliza aquí denota cada par de cadenas ligeras y pesadas que están directamente involucradas en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios de las cadenas ligeras y pesadas variables humanas tienen la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR) cuyas secuencias están ampliamente conservadas, conectadas por tres “regiones hipervariables” (o regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las regiones marco adoptan una conformación de lámina β y las CDR pueden formar bucles que conectan la estructura de lámina β . Las CDR de cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional a través de las regiones marco y formar junto con las CDR de la otra cadena el punto de unión del antígeno. Las regiones CDR3 de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo juegan un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de la unión de los anticuerpos de acuerdo con la invención y por lo tanto proporcionan otro objeto de la invención.

Los términos “región hipervariable” o “porción de unión del antígeno de un anticuerpo”, como se utiliza aquí, se refiere a los residuos aminoacídicos de un anticuerpo que son responsables de la unión del antígeno. La región hipervariable comprende los residuos aminoacídicos de las “regiones determinantes de complementariedad” o “CDR”. Las regiones “marco” o “FR” como se define aquí, son aquellas regiones del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable. Por lo tanto, las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo comprenden de N- a C-terminal los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Especialmente, la CDR3 de la cadena pesada es la región que contribuye la mayor parte de la unión del antígeno. Las regiones CDR y FR se determinan de acuerdo con la definición estándar de Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) y/o aquellos residuos de un “bucle hipervariable”.

El término “unión a IGF-IR” tal como se utiliza aquí significa la unión del anticuerpo al IGF-IR en un ensayo *in vitro*, preferiblemente en un ensayo de unión en el que el anticuerpo está unido a una superficie y la unión de IGF-IR se mide mediante Resonancia de Plasmón en Superficie (SPR). Unión significa una afinidad de unión (K_D) de 10^{-8} M o inferior, preferiblemente 10^{-13} a 10^{-9} M.

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

La unión de IGF-I e IGF-II al IGF-IR también está inhibida por los anticuerpos de acuerdo con la invención. La inhibición se mide como CI_{50} en un ensayo para la unión de IGF-I/IGF-II al IGF-IR en células tumorales. Tal ensayo está descrito en el Ejemplo 7. En dicho ensayo, la cantidad de IGF-I o IGF-II o fragmentos de unión a IGF-IR de los mismos radiomarcados unidos al IGF-IR proporcionados en la superficie de dichas células tumorales (por ejemplo HT29) se mide sin y con concentraciones aumentadas del anticuerpo. Los valores de CI_{50} de los anticuerpos de acuerdo con la invención para la unión de IGF-I y IGF-II al IGF-IR no son superiores a 2 nM y la proporción de los valores de CI_{50} para la unión de IGF-I/IGF-II al IGF-IR es de alrededor de 1:3 a 3:1. Los valores de CI_{50} se miden como los valores de la media o mediana de al menos tres mediciones independientes. Los valores de CI_{50} únicos están fuera de rango.

El término “inhibir la unión de IGF-I e IGF-II al IGF-IR” tal como se utiliza aquí se refiere a inhibir la unión de IGF-I o IGF-II marcados con I¹²⁵ al IGF-IR presentado en la superficie de las células tumorales HT29 (ATCC HTB-38) en un ensayo *in vitro*. Inhibir significa un valor de CI₅₀ de 2 nM o inferior.

El término “células que expresan IGF-IR” se refiere a las células que sobreexpresan el receptor IGF-I en al menos 20.000 receptores/célula. Dichas células son, por ejemplo, líneas celulares tumorales como NCI H322M o HT29, o una línea celular (por ejemplo 3T3 ATCC CRL1658) que sobreexpresa IGF-IR después de la transfección con un vector de expresión para IGF-IR. La cantidad de receptores por célula se mide de acuerdo con Lammers, R., *et al.*, EMBO J. 8 (1989) 1369-1375.

El término “inhibición de la fosforilación de IGF-IR” se refiere a un ensayo de fosforilación celular utilizando células 3T3 que proporcionan de 400.000 a 600.000 moléculas de IGF-IR por célula en un medio que contiene suero fetal bovino (FCS) al 0,5% inactivado por calor cuando se compara con dicho ensayo sin dicho anticuerpo. La fosforilación se detecta mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico para las proteínas fosforiladas en la tirosina. Dicho ensayo se describe en el Ejemplo 11. La inactivación por calor del FCS se realiza mediante un calentamiento por un corto periodo de tiempo a 56°C para inactivar el sistema del complemento.

El término “inhibición de la fosforilación de PKB” se refiere a un ensayo de fosforilación celular utilizando células 3T3 que proporcionan de 400.000 a 600.000 moléculas de IGF-IR por célula en un medio que contiene suero fetal bovino (FCS) al 0,5% inactivado por calor cuando se compara con dicho ensayo sin dicho anticuerpo. La fosforilación se detecta mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico para el PKB fosforilado en la serina 473 del PKB (Akt 1, N° Acceso del Swiss Prot P31749). Dicho ensayo se describe en el Ejemplo 11.

El término “citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)” se refiere a la lisis de células tumorales humanas mediante un anticuerpo de acuerdo con la invención en presencia de células efectoras. La ADCC se mide preferiblemente mediante el tratamiento de una preparación de células que expresan IGF-IR con un anticuerpo de acuerdo con la invención en presencia de células efectoras como las recién aisladas PBMC o células efectoras purificadas de la capa leucocitaria, como los monocitos o las células NK. La ADCC se encuentra si el anticuerpo induce la lisis (muerte celular) del 20% o más de las células tumorales tras 24 horas a una concentración de 100 nM. Si la ADCC se encuentra que es más pronunciada a las 4 h que a las 24 h, entonces la medición se realiza a las 4 h. El ensayo se realiza preferiblemente con células tumorales marcadas con ⁵¹Cr o Eu y se mide específicamente la liberación de ⁵¹Cr o Eu. Los controles incluyen la incubación de las células tumorales diana con las células efectoras pero sin el anticuerpo.

El término “citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)” se refiere a la lisis de células tumorales humanas mediante un anticuerpo de acuerdo con la invención en presencia del complemento. La CDC se mide preferiblemente mediante el tratamiento de una preparación de células que expresan IGF-IR con un anticuerpo de acuerdo con la invención en presencia del complemento. La CDC se encuentra si el anticuerpo induce la lisis (muerte celular) del 20% o más de las células tumorales tras 4 horas a una concentración de 100 nM. El ensayo se realiza preferiblemente con células tumorales marcadas con ⁵¹Cr o Eu y se mide la liberación de ⁵¹Cr o Eu. Los controles incluyen la incubación de las células tumorales diana con el complemento pero sin el anticuerpo.

El término “inhibición completa de la transducción de señales mediadas por IGF-I” se refiere a la inhibición de la fosforilación de IGF-IR mediada por IGF-I. Para dicho ensayo, las células que expresan IGF-IR, preferiblemente las células H322M, se estimulan con IGF-I y se tratan con un anticuerpo de acuerdo con la invención (es útil una concentración de anticuerpo de 5 nM o superior). En consecuencia, se realiza un SDS PAGE y se mide la fosforilación de IGF-IR mediante análisis por Western blot con un anticuerpo específico para la tirosina fosforilada. La inhibición completa de la transducción de señales se encuentra si en el Western blot no se detecta de forma visible ninguna banda que se refiera al IGF-IR fosforilado.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención muestran una unión al mismo epítipo de IGF-IR que el anticuerpo 18 o están inhibidos en la unión al IGF-IR debido a un impedimento estérico de la unión gracias al anticuerpo 18. La inhibición de la unión puede detectarse mediante un ensayo SPR utilizando el anticuerpo 18 inmovilizado y el IGF-IR a una concentración de 20-50 nM y el anticuerpo a detectar a una concentración de 100 nM. Una reducción de la señal del 50% o más muestra que el anticuerpo compite con el anticuerpo 18. Dicho ensayo puede realizarse de la misma forma pero utilizando el anticuerpo 22 como anticuerpo inmovilizado.

El término “epítipo” significa cualquier determinante de proteína capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítopos normalmente consisten en agrupamientos de moléculas químicamente activas en superficie, como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares, y que normalmente poseen características estructurales tridimensionales específicas así como características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y los no conformacionales se distinguen en que no hay unión a los conformacionales pero sí en los no conformacionales en presencia de solventes desnaturizantes.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención incluyen, además, dichos anticuerpos que poseen “modificaciones de secuencia conservativas”, nucleótidos y modificaciones de secuencia de aminoácidos que no afectan o alteran las características mencionadas anteriormente del anticuerpo de acuerdo con la invención. Las modificaciones pueden introducirse mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, como la mutagénesis dirigida al sitio y la mutagéne-

sis mediada por PCR. Las sustituciones conservativas de aminoácidos incluye las que el residuo de aminoácido está sustituido con un residuo de aminoácido que posee una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácido que poseen cadenas laterales similares han sido definidos en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Así, un residuo de aminoácido no esencial predicho en un anticuerpo humano anti-IGF-IR puede estar preferiblemente sustituido por otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales.

Pueden realizarse sustituciones de aminoácidos mediante mutagénesis basada en el modelaje molecular tal como se describe en Riechmann, L., *et al.*, Nature 332 (1988) 323-327 y Queen, C., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033.

En una realización preferible de la invención, los anticuerpos de acuerdo con la invención se caracterizan además por una o más características seleccionadas del grupo seleccionado de los parámetros de unión K_a , K_d y K_D , que se unen al mismo epítipo que los anticuerpos 18 y 22, los valores de CI_{50} para la inhibición de la unión de IGF-I e IGF-II al IGF-IR en células tumorales, y los valores de CI_{50} para la inhibición de la fosforilación de IGF-IR tras la estimulación de IGF-I en células tumorales. La inhibición de la fosforilación de IGF-IR conduce a la inhibición de la fosforilación de elementos corriente abajo como el PKB, la regulación negativa de IGF-IR en células tumorales, y la influencia en el crecimiento tridimensional de células tumorales *in vitro*. Los anticuerpos se caracterizan además preferiblemente por sus valores farmacocinéticos y farmacodinámicos, y la reactividad cruzada para otras especies.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención inhiben la fosforilación de la tirosina del IGF-IR y preferiblemente también la fosforilación de la tirosina de PKB en una extensión similar.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención preferiblemente regulan negativamente el nivel de proteína de IGF-IR en células tumorales y en tumores, por ejemplo en tumores xenoinjertados.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención inhiben preferiblemente el crecimiento tridimensional de las células tumorales en un ensayo de formación de colonias así como la proliferación de las células que expresan IGF-IR (por ejemplo células NIH 3T3).

Los anticuerpos de acuerdo con la invención preferiblemente no inhiben la unión de la insulina al receptor de la insulina en un ensayo de competición de unión en células 3T3 que sobreexpresan el receptor de la insulina utilizando el anticuerpo en una concentración de 200 nmol/l.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención se producen preferiblemente mediante métodos recombinantes. Tales métodos son ampliamente conocidos en el estado de la técnica y comprenden expresión de proteínas en células procariotas y eucariotas con el posterior aislamiento del polipéptido del anticuerpo y normalmente la purificación en una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de proteína, los ácidos nucleicos que codifican las cadenas pesada y ligera o fragmentos de las mismas se insertan en el vector de expresión mediante métodos estándar. La expresión se realiza en células huésped procariotas o eucariotas apropiadas como las células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, levaduras, o células de *E. coli*, y se recupera el anticuerpo de las células (sobrenadante o células tras la lisis).

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

Los anticuerpos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. La purificación se realiza para eliminar otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo otros ácidos nucleicos celulares o proteínas, mediante técnicas estándar, que incluye tratamiento alcalino/SDS, bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa, y otros bien conocidos en la técnica. Véase Ausubel, F., *et al.*, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing y Wiley Interscience, New York (1987).

La expresión en células NS0 se describe en, por ejemplo, Barnes, L.M., *et al.*, Cytotechnology 32 (2000) 109-123; y Barnes, L.M., *et al.*, Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261-270. La expresión transitoria se describe en, por ejemplo, Durocher, Y., *et al.*, Nucl. Acids. Res. 30 (2002) E9. El clonaje de los dominios variables se describe en Orlandi, R., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289; y Norderhaug, L., *et al.*, J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87. Un sistema de expresión transitorio preferible (HEK 293) se describe en Schlaeger, E.-J., y Christensen, K., en Cytotechnology 30 (1999) 71-83 y en Schlaeger, E.-J., en J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199.

Las secuencias control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operador y un punto de unión del ribosoma. Las células eucariotas utilizan promotores, potenciadores y señales de poliadenilación.

Un ácido nucleico está "ligado de forma operativa" si está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el DNA de una presecuencia o líder secretor está ligado de forma operativa al DNA de un polipéptido si se expresa como preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está ligado de forma operativa a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un lugar de unión a ribosomas está ligado de forma operativa a una secuencia codificante si está posicionado de forma que facilita la traducción. Generalmente, "ligado de forma operativa" significa que las secuencias de DNA ligadas están contiguas, y en el caso de un líder secretor, contiguas y en marco de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se consigue mediante una ligación en las dianas de restricción convenientes. Si tales dianas no existen, se utilizan adaptadores o enlazantes sintéticos oligonucleotídicos de acuerdo con la práctica convencional.

Los anticuerpos monoclonales están separados de forma adecuada del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas como, por ejemplo, proteína A - Sefarosa, cromatografía en hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. Los DNA y RNA que codifican los anticuerpos monoclonales se aíslan y secuencian fácilmente utilizando procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir como fuente de tales DNA y RNA. Una vez aislados, los DNA pueden insertarse en vectores de expresión, que entonces se transfieren en células huésped como las células HEK 293, células CHO o células de mieloma que de otro modo no producirían las proteínas de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células huésped.

Las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti IGF-IR humano se preparan introduciendo los cambios de nucleótido apropiados en el DNA del anticuerpo, o mediante la síntesis de péptidos. Tales modificaciones pueden realizarse, sin embargo, sólo en un rango muy limitado, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, las modificaciones no alteran las características anteriormente mencionadas del anticuerpo como el isotipo de la IgG y la unión del epítipo, pero pueden mejorar el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad de la proteína o facilitar la purificación.

También puede sustituirse cualquier residuo de cisteína que no está involucrado en mantener la correcta conformación del anticuerpo anti-IGF-IR, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir el entrecruzamiento aberrante. Contrariamente, pueden añadirse enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo como el fragmento Fv).

Otro tipo de variante de aminoácidos del anticuerpo es el que altera el patrón de glucosilación original del anticuerpo. Por alterar, se entiende eliminar una o más porciones de carbohidratos que se encuentran en el anticuerpo, y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo. La glucosilación de los anticuerpos es normalmente del tipo N-unido. N-unido se refiere a la unión de la porción de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptidos asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en la que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de la porción de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La adición de los sitios de glucosilación al anticuerpo se logra de forma adecuada por la alteración de la secuencia de aminoácidos como la que contiene una o más de las secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para los sitios de glucosilación N-unidos).

Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-IGF-IR se preparan mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de las variantes de secuencia de aminoácido naturales) o preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigida), mutagénesis por PCR, y mutagénesis en casete de una variante preparada con anterioridad o una versión sin variar del anticuerpo anti-IGF-IR humanizado.

La invención también pertenece a los inmunoconjugados que comprenden el anticuerpo de acuerdo con la invención conjugado con un agente citotóxico como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de los mismos), un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado) o un profármaco de un agente citotóxico. Los agentes útiles en la generación de tales inmunoconjugados se han descrito anteriormente. Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden utilizarse incluyen la cadena A de la difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina de la difteria, cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de la ricina, cadena A de la abrina, cadena A de la modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleuritesfordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de *momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

Los conjugados del anticuerpo y del agente citotóxico se crean utilizando una serie de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales como el propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres; (como adipimidato de dimetilo HCL), ésteres activos (como sustrato de disuccinimidilo), aldehídos (como glutaraldehído), compuestos bis-azido (como bis(p-azidobenzoyl) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoyl)-etilendiantrina), diisocianatos (como tolieno 2,6-diisocianato), y com-

puestos fluor bis-activos (como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzén). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricino puede prepararse como se ha descrito en Vitetta, E.S., *et al.*, Science 238 (1987) 1098-1104). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilén triaminapentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionucleótidos con el anticuerpo. Véase WO 94/11026.

Otro tipo de modificación covalente involucra glicósidos de acoplamiento químico o enzimático al anticuerpo. Estos procedimientos son ventajosos ya que no requieren de la producción del anticuerpo en una célula huésped que posea capacidades de glucosilación para la glucosilación N- o O-unida. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el(los) azúcar(es) puede(n) estar unido(s) a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres como los de la cisteína, (d) grupos hidroxilo libres como los de la serina, treonina, o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos como los de la fenilalanina, tirosina, o triptófano, o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos se describen en WO 87/05330, y en Aplin, J.D., y Wriston, J.C. Jr., CRC Crit. Rev. Biochem. (1981) 259-306.

La eliminación de cualquier porción de carbohidrato presente en el anticuerpo puede lograrse de forma química o enzimática. La desglucosilación química requiere de la exposición del anticuerpo al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento resulta en la escisión de la mayoría o de todos los azúcares excepto el azúcar enlazante (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando el anticuerpo intacto. La desglucosilación química se describe en Sojhr, H.T., y Bahl, O.P., Arch. Biochem. Biophys. 259 (1987) 52-57 y en Edge, A.S., *et al.* Anal. Biochem. 118 (1981) 131-137. La escisión enzimática de las porciones de carbohidrato en los anticuerpos puede lograrse mediante la utilización de una serie de endo- y exo-glucosidasas como las descritas por Thotakura, N.R., y Bahl, O.P., Meth. Enzymol. 138 (1987) 350-359.

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende la unión del anticuerpo a una serie de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, o polioxialquilenos, de la forma descrita en las Patentes Estadounidenses N° 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337.

En aún otro aspecto, la invención proporciona células B aisladas de un animal transgénico no humano, por ejemplo un ratón transgénico, que expresa los anticuerpos anti IGF-IR humanos de acuerdo con la invención. Preferiblemente, las células B aisladas se obtienen de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que se ha inmunizado con una preparación purificada o enriquecida de antígeno IGF-IR y/o células que expresan IGF-IR. Preferiblemente, el animal transgénico no humano, por ejemplo un ratón transgénico, posee un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana que codifican toda o una porción de un anticuerpo de la invención. Estas células B aisladas se immortalizan entonces para proporcionar una fuente (por ejemplo un hibridoma) de anticuerpos anti-IGF-IR humano. De acuerdo con esto, la presente invención también proporciona un hibridoma capaz de producir anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con la invención. En una realización, el hibridoma incluye una célula B obtenida de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico que posee un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana que codifican toda o una porción de un anticuerpo de la invención, fusionado a una célula immortalizada.

En una realización particular, el animal transgénico no humano es un ratón transgénico que posee un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana que codifican toda o una porción de un anticuerpo de la invención. El animal transgénico no humano puede inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida de antígeno IGF-IR y/o células que expresan IGF-IR. Preferiblemente, el animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, es capaz de producir isotipos de IgG1 de anticuerpos monoclonales humanos frente a IGF-IR.

Los anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con la invención pueden producirse mediante la inmunización de un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, que posee un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana que codifican toda o una porción de un anticuerpo de la invención, con una preparación purificada o enriquecida de antígeno IGF-IR y/o células que expresan IGF-IR. Las células B (por ejemplo células B del bazo) del animal se obtienen entonces y se fusionan con células de mieloma para formar células de hibridoma inmortales, que secretan anticuerpos monoclonales humanos frente a IGF-IR.

En una realización preferible, los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos frente a IGF-IR pueden generarse utilizando ratones transgénicos portadores de partes del sistema inmune humano en lugar del sistema murino. Estos ratones transgénicos, referidos aquí como ratones "HuMab", contienen un minilocus del gen de la inmunoglobulina humana que codifica los genes de la inmunoglobulina humana no redistribuidos que incluye la cadena pesada (μ y γ) y la cadena ligera κ (genes de las regiones constantes), junto con las mutaciones dirigidas que inactivan los loci de las cadenas endógenas μ y κ (Lonberg, N., *et al.*, Nature 368 (1994) 856-859). De acuerdo con esto, los ratones presentan una expresión reducida de la IgM o K de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes introducidos de las cadenas pesada y ligera humanas producen un cambio de clase y una mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG humanos de alta afinidad (Lonberg, N., *et al.*, Nature 368 (1994) 856-859; revisado en Lonberg, N., Handbook of Experimental Pharmacology 113 (1994) 49-101; Lonberg, N., y Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. 25 (1995) 65-93; y Harding, F., y Lonberg, N., Ann. N. Acad. Sci 764 (1995) 536-546). La preparación de ratones HuMab se describe en Taylor, L., *et al.*, Nucleic Acids Research 20 (1992) 6287-6295; Chen, J., *et al.*, International Immunology 5 (1993) 647-656; Tuailon, N., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 90 (1993) 3720-3724; Choi, T.K., *et*

al., Nature Genetics 4 (1993) 117-123; Chen, J., *et al.*, EMBO J. 12 (1993) 821-830; Tuailon, N., *et al.*, Immunol. 152 (1994) 2912-2920; Lonberg, N., *et al.*, Nature 368 (1994) 856-859; Lonberg, N., Handbook of Experimental Pharmacology 113 (1994) 49-101; Taylor, L., *et al.*, Int. Immunol. 6 (1994) 579-591; Lonberg, N., y Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. 25 (1995) 65-93; Harding, F., y Lonberg, N., Ann. N. Acad. Sci. 764 (1995) 536-546; Fishwild, D.M., *et al.*, Nat. Biotechnol. 14 (1996) 845-851. Véase además, Patentes Estadounidenses N° 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; 5.545.807; 5.770.429; WO 98/24884; WO 94/25585; WO 93/1227; WO 92/22645; y WO 92/03918.

Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos frente a IGF-IR, los ratones HuMAb pueden inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida de antígeno IGF-IR y/o células que expresan IGF-IR de acuerdo con el método general, como se describe en Lonberg, N., *et al.*, Nature 368 (1994) 856-859; Fishwild, D.M., *et al.*, Nat. Biotechnol. 14 (1996) 845-851 y WO 98/24884. Preferiblemente, los ratones serán de 6-16 semanas de edad en la primera inmunización. Por ejemplo, puede utilizarse una preparación purificada o enriquecida de antígeno IGF-IR soluble (por ejemplo purificado a partir de células que expresan IGF-IR) para inmunizar los ratones HuMAb por vía intraperitoneal. En el caso de que las inmunizaciones utilizando una preparación purificada o enriquecida de antígeno IGF-IR no resulte en anticuerpos, los ratones pueden también inmunizarse con células que expresan IGF-IR, por ejemplo, una línea de células tumorales, para promover la respuesta inmune. La experiencia adquirida con varios antígenos mostró que los ratones transgénicos HuMAb responden mejor cuando se inmunizan inicialmente por vía intraperitoneal (i.p.) con antígeno en adyuvante completo de Freund, seguido por cualquier otra inmunización semanal i.p. (por ejemplo, hasta un total de 6) con antígeno en adyuvante incompleto de Freund. La respuesta inmune puede monitorizarse durante el curso del protocolo de inmunización con muestras de plasma obtenidas por sangrados retroorbitales. El plasma puede analizarse mediante ELISA, y pueden utilizarse los ratones con una titulación suficiente de inmunoglobulina humana anti-IGF-IR para la inmortalización de las correspondientes células B. Los ratones pueden inyectarse de nuevo por vía intravenosa con antígeno, 3 o 4 días antes de su sacrificio y de la extracción del bazo y de los nódulos linfáticos. Se espera que sea necesario realizar 2-3 fusiones por cada antígeno. Muchos ratones se inmunizarán por cada antígeno. Por ejemplo, pueden inmunizarse un total de doce ratones HuMAb de las cepas HCo7 y HCo12.

Los ratones HCo7 poseen una disrupción JKD en sus genes endógenos de la cadena ligera (kappa) (como se describe en Chen, J., *et al.*, EMBO J. 12 (1993) 821-830), una disrupción CMD en sus genes endógenos de la cadena pesada (como se describe en el Ejemplo 1 de WO 01/14424), un transgén KCo5 humano de la cadena ligera kappa (como se describe en Fishwild, D.M., *et al.*, Nat. Biotechnol. 14 (1996) 845-851), y un transgén HCo7 humano de la cadena pesada (como se describe en la Patente Estadounidense N° 5.770.429).

Los ratones HCo12 poseen una disrupción JKD en sus genes endógenos de la cadena ligera (kappa) (como se describe en Chen, J., *et al.*, EMBO J. 12 (1993) 821-830), una disrupción CMD en sus genes endógenos de la cadena pesada (como se describe en el Ejemplo 1 de WO 01/14424), un transgén KCo5 humano de la cadena ligera kappa (como se describe en Fishwild, D.M., *et al.*, Nat. Biotechnol. 14 (1996) 845-851), y un transgén HCo12 humano de la cadena pesada (como se describe en el Ejemplo 2 de WO 01/14424).

Pueden aislarse los linfocitos de ratón y fusionarse con una línea celular de mieloma de ratón utilizando PEG basado en los protocolos estándar para generar hibridomas. Los hibridomas resultantes se criban entonces para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, las suspensiones celulares únicas de linfocitos esplénicos y de linfocitos derivados de los nódulos linfáticos a partir de ratones inmunizados se fusionan hasta un sexto de la cantidad de células de mieloma de ratón no secretoras SP 2/0 (ATCC, CRL 1581) con 50% de PEG. Las células se plaquean a aproximadamente 2×10^5 en placas microtituladas de fondo plano, seguido por cerca de dos semanas de incubación en medio selectivo.

Los pocillos individuales se analizan por ELISA para la presencia de anticuerpos monoclonales IgM e IgG humanos anti-IGF-IR. Una vez aparezca un crecimiento extensivo del hibridoma, se analiza el medio, normalmente tras 10-14 días. Los hibridomas que secretan anticuerpo se replaquean, se analizan de nuevo, y si son positivos para anticuerpos monoclonales IgG humanos anti-IGF-IR, pueden subclonarse al menos dos veces mediante dilución limitante. Los subclones estables se cultivan entonces *in vitro* para producir anticuerpos en medio de cultivo de tejidos para su caracterización.

Ya que las secuencias CDR son responsables de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar los anticuerpos recombinantes de acuerdo con la invención construyendo vectores de expresión que incluye las secuencias CDR de acuerdo con la invención en secuencias marco de otros anticuerpos humanos diferentes (véase, por ejemplo, Riechmann, L., *et al.*, Nature 332 (1998) 323-327; Jones, P., *et al.*, Nature 321 (1986) 522-525; y Queen, C., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Véase U.S.A. 86 (1989) 10029-10033). Tales secuencias marco pueden obtenerse de las bases de datos públicas de DNA que incluye las secuencias génicas de anticuerpo humano de línea germinal. Estas secuencias de línea germinal difieren de las secuencias génicas del anticuerpo maduro debido a que éstas no incluyen genes variables completamente ensamblados, que están formados por la unión V(D)J durante la maduración de las células B. las secuencias génicas de línea germinal también difieren de las secuencias de un anticuerpo de repertorio secundario de alta afinidad incluso a través de la región variable individual.

La invención preferiblemente comprende un fragmento de ácido nucleico que codifica un polipéptido que se une al IGF-IR, en el que dicho polipéptido inhibe la unión de IGF-I e IGF-II al IGF-IR, seleccionado del grupo que consiste en

a) una cadena pesada de anticuerpo que comprende los CDR, CDR1 (aa 31-35), CDR2 (aa 50-66) y CDR3 (aa 99-107) del Id. de Sec. N° 1 o 3;

b) una cadena ligera de anticuerpo que comprende los CDR, CDR1 (aa 24-34), CDR2 (aa 50-56) y CDR3 (aa 89-98) del Id. de Sec. N° 2 o 4.

Las regiones variables de las cadenas ligera y pesada reconstruidas se combinan con secuencias de promotor, inicio de traducción, región constante, 3' sin traducir, poliadenilación, y finalización de la transcripción para formar construcciones de vectores de expresión. Las construcciones de expresión de la cadena pesada y ligera pueden combinarse en un único vector, cotransfectarse, transfectarse de forma seriada, o transfectarse separadamente en células huésped que están entonces fusionadas para formar una célula huésped única que expresa ambas cadenas.

De acuerdo con esto, la invención proporciona un método para la producción de un anticuerpo recombinante humano de acuerdo con la invención, que se caracteriza por la expresión de un ácido nucleico que codifica

a) una cadena pesada de anticuerpo que comprende los CDR, CDR1 (aa 31-35), CDR2 (aa 50-66) y CDR3 (aa 99-107) del Id. de Sec. N° 1 o 3;

b) una cadena ligera de anticuerpo que comprende los CDR, CDR1 (aa 24-34), CDR2 (aa 50-56) y CDR3 (aa 89-98) del Id. de Sec. N° 2 o 4.

La invención comprende además la utilización de un anticuerpo de acuerdo con la invención para la detección de IGF-IR *in vitro*, preferiblemente mediante un ensayo inmunológico para determinar la unión entre IGF-IR de una muestra y el anticuerpo de acuerdo con la invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo una composición farmacéutica, que contiene un o una combinación de anticuerpos monoclonales humanos, o la porción de unión a antígeno de los mismos, de la presente invención, formulado junto con un transportador farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinado con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir una composición de la presente invención con al menos un agente anti-tumoral u otra terapia convencional.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluye Adriamicina, Doxorubicina, 5-Fluorouracilo, Citosina arabinósido ("Ara-C"), Ciclofosfamida, Tiotepa, Taxotere (docetaxel), Busulfán, Gemcitabina, Citoxina, Taxol, Metotrexato, Cisplatino, Melfalán, Vinblastina, Bleomicina, Etopósido, Ifosfamida, Mitomicina C, Mitoxantrona, Vincristina, Vinorelbina, Carboplatino, Tenipósido, Daunomicina, Carminomicina, Aminopterina, Dactinomicina, Mitomicina, Esperamicinas (véase Patente Estadounidense N° 4.675.187), Melfalán y otras mostazas nitrogenadas relacionadas.

El término "agente citotóxico" tal como se utiliza aquí se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o provoca la destrucción celular. El término pretende incluir isótopos radioactivos, agentes quimioterapéuticos, y toxinas como las toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.

El término "profármaco" tal como se utiliza en esta solicitud se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica en células tumorales en comparación con el fármaco parental y que puede activarse enzimáticamente o convertirse en la forma parental más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986), y Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", Directed Drug Delivery, Borchardt *et al.*, (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de esta invención incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos con D-aminoácidos modificados, profármacos glicosilados, profármacos con anillo β -lactámico, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, profármacos con 5-fluorocitosina y otros profármacos con 5-fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco libre citotóxico más activo. Ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden transformarse a la forma de profármaco para su uso en esta invención incluyen, pero no se limitan a, aquellos agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

Tal como se utiliza aquí, "transportador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier disolvente, medio de dispersión, recubrimiento, agente antibacteriano y antifúngico, agente isotónico y retardante de la absorción, y similares que sea fisiológicamente compatible. Preferiblemente, el transportador es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral o espinal (por ejemplo, mediante inyección o infusión).

Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del anticuerpo y no muestra ningún efecto toxicológico indeseado (véase por ejemplo, Berge, S.M., *et al.*, J. Pharm. Sci. 66 (1977) 1-19). Tales sales están incluidas en la invención. Ejemplos de tales sales incluyen las sales de adición ácida y básica. Las sales de adición ácida incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, como las sales de clorhidrato.

Una composición de la presente invención puede administrarse mediante una variedad de métodos conocidos en la materia. Como podrá apreciarse por un experto en la materia, la ruta y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados.

5 Para administrar un compuesto de la invención mediante ciertas vías de administración, puede ser necesario recurrir al compuesto o coadministrar el compuesto junto con un material para prevenir su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse a un sujeto en un transportador apropiado, por ejemplo, liposomas o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen la solución salina y las soluciones de tampón acuoso.

10 Los transportadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones y polvos estériles para la posterior preparación de soluciones o dispersiones estériles inyectables. El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la materia.

15 Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" tal como se utiliza aquí indican modos de administración diferentes de la administración enteral y tópica, normalmente por inyección, e incluyen, sin limitación, la inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

20 Estas composiciones pueden también contener adyuvantes como los conservantes, agentes humectantes, agentes emulsificantes y agentes dispersantes. La prevención de presencia de microorganismos puede asegurarse mediante un proceso de esterilización, anterior, y mediante la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorbutanol, fenol y ácido sórbico. También puede ser deseable incluir en las composiciones agentes isotónicos, como azúcares o cloruro sódico. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable
25 puede conseguirse mediante la inclusión de agentes que retardan la absorción como el monostearato de aluminio y la gelatina.

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

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos pueden variarse en las composiciones farmacéuticas de la presente invención con el fin de obtener una cantidad de ingrediente activo que sea efectiva para alcanzar la
35 respuesta terapéutica deseada para un paciente en particular, composición, y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares empleadas de la presente invención, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular a emplear, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas,
40 la edad, sexo, peso, condición, salud general e historia médica previa del paciente a ser tratado, y factores similares bien conocidos en la ciencia médica.

La composición debe ser estéril y fluida de modo que la composición sea dosificable mediante una jeringa. Además del agua, el transportador es preferiblemente una solución salina isotónica.
45

Se puede mantener una fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de recubridores como la lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos en la composición, por ejemplo, azúcares, polialcoholes como el manitol o sorbitol, y cloruro de sodio.
50

Descripción del listado de secuencias

Id. de Sec. N° 1-4 Secuencias de nucleótido y aminoácidos de los dominios de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos 18 y 22.
55

Id. de Sec. N° 5 y 6 Secuencias de nucleótido y aminoácidos del dominio de la región constante humana.

Descripción de las figuras

60 Figura 1 Expresión en superficie de IGF-IR en cultivos a baja y elevada densidad celular.

Figura 2 Ensayo WST (células NCI H322M) de inhibición de la proliferación en cultivo 3D.

Figura 3 Ensayo de formación de colonias para la inhibición de la proliferación en cultivo 3D (imagen microscópica).
65

Figura 4 Ensayo de formación de colonias para la inhibición de la proliferación en cultivo 3D (cuantificación). ctr = control; CI 18 = anticuerpo 18.

ES 2 317 020 T3

Figura 5 Inhibición de la unión de I¹²⁵-IGF-I a las células HT29 por los anticuerpos 18 y 22 (valores CI₅₀).

Figura 6 Inhibición de la unión de I¹²⁵-IGF-II a las células HT29 por el anticuerpo 18.

5 Figura 7 Inhibición de la unión de I¹²⁵-IGF-II a las células HT29 por el anticuerpo α IR3.

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

10 Figura 9 No inhibición de la unión de la insulina-I¹²⁵ a las células 3T3-IR por los anticuerpos anti-hIGF-1R. (MAX sin Ab: unión máxima de insulina-I¹²⁵; MIN: unión mínima tras la competición con insulina 1 μ m)

Figura 10 Actividades no estimuladoras de AK18 sobre células 3T3 que sobreexpresan IGF-IR.

Figura 11 Actividades no estimuladoras de AK18 sobre células tumorales (HT29) humanas.

15 Figura 12 Regulación negativa del IGF-IR expuesto en la superficie de células H322N por el anticuerpo 18 *in vitro*.

Figura 13 Tratamiento con AK18, volumen del tumor primario.

20 Figura 14 Tratamiento con AK18 con o sin gemcitabina.

Figura 15 Tratamiento con AK18, volumen del tumor primario.

Ejemplo 1

25 *Generación de una línea celular de hibridoma que produce anticuerpos anti-IGF-IR*

Cultivo de hibridomas

30 Los hibridomas generados con HuMAb se cultivaron en Hybridoma Express Medium (PAA Laboratories GmbH, Austria) suplementados con L-glutamina 2 mM (BioWhittaker) y Origen Cloning Factor al 4% (Igen, Francia) a 37°C y CO₂ al 5%.

Procedimiento de inmunización de ratones transgénicos

35 Diez ratones transgénicos HCo7 (4 machos y 6 hembras), cepa GG2201 (Medarex, San José, CA, USA) se inmunizaron de forma alterna con 1x10⁶ células NIH 3T3, se transfectaron con un vector de expresión para IGF-IR, y 20 μ g de dominio extracelular soluble de IGF-IR. Se realizaron seis inmunizaciones en total, tres inmunizaciones intraperitoneales (IP) con las células que expresan IGF-IR y tres inmunizaciones subcutáneas (SC) en la base de la cola con la proteína recombinante. Para la primera inmunización, 100 μ l de 1x10⁶ células NIH 3T3 que expresan IGF-IR se mezclaron con 100 μ l de adyuvante completo de Freund (CFA; Difco Laboratories, Detroit, USA). Para el resto de inmunizaciones, se utilizaron 100 μ l de células en PBS o la proteína recombinante se mezcló con 100 μ l de adyuvante incompleto de Freund (ICFA; Difco).

ELISA específico de antígeno

45 Se determinó la titulación de anti-IGF-IR en suero de los ratones inmunizados mediante ELISA específico de antígeno. El dominio extracelular soluble de IGF-IR a una concentración de 1 μ g/ml en PBS se recubrió durante la noche a 4°C, o durante dos horas a 37°C, en placas de 96 pocillos. Posteriormente, los pocillos se bloquearon con PBSTC (PBS suplementado con Tween[®]-20 al 0,05% y suero de pollo al 2% (Gibco BRL)) durante 1 hora (h) a temperatura ambiente. La primera extracción de suero se diluyó 1/50 en PBSTC, los sueros del resto de extracciones se pre-diluyeron 1/100 en PBSTC y se diluyeron de forma seriada hasta 1/6400. Los sueros diluidos se añadieron a los pocillos y se incubaron durante 1 h a 37°C. El suero preextracción se utilizó como control negativo. Se utilizó como control positivo 200 ng/ml de anticuerpo de cabra anti-IGF-IR humano (100 μ g/ml). Posteriormente, las placas se lavaron dos veces con PBST y se incubaron con F(ab')₂ de rata anti-IgG humano conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) de (DAKO), diluido 1/2000 en PBSTC durante 1 h a 37°C. Los pocillos se lavaron dos veces con PBST y se realizaron los ensayos con solución ABTS[®] recién preparada (1 mg/ml) (ABTS: 2,2'-azino bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA) en la oscuridad. Se midió la absorbancia a 405 nm.

Análisis por FACS

60 Además de la determinación mediante ELISA específico de antígeno, se determinaron también las titulaciones de anti-IGF-IR en suero de ratones inmunizados mediante análisis por FACS. Se incubaron células NIH 3T3 IGF-IR y células NIH 3T3 IGF-IR no transfectadas con suero diluido durante 30 minutos a 4°C. El suero preextracción se añadió como control negativo. Inicialmente, se utilizó como control positivo 200 ng/ml de anticuerpo de cabra anti-IGF-IR humano. Las células se lavaron tres veces en PBS suplementado con suero de albúmina bovina al 1% y azida al 0,01%. Posteriormente, se incubaron las células con fragmentos de unión a antígeno (fragmentos F(ab')₂ de rata anti-IgG humano conjugadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC) diluidos 1/100 en tampón FACS, durante 30

minutos a 4°C. Las células se lavaron dos veces en tampón FACS y se analizaron las muestras en un FACSCalibur (Becton Dickinson, Erembodegem- Aalst, Bélgica).

Potenciación de la inmunización de ratones

Cuando la titulación de los sueros de anti-IGF-IR fueron suficientes, los ratones se inyectaron adicionalmente dos veces con 15 µg de dominio extracelular de IGF-IR en 200 µl de PBS intravenoso (i.v.) 4 y 3 días antes de la fusión.

Generación de Hibridoma

Los ratones se sacrificaron y se les extrajo el bazo y los nodos linfáticos circundantes de la aorta abdominal y la vena cava. La fusión de los esplenocitos y de las células de los nodos linfáticos con las células pareja de fusión SP 2/0 se realizó según los procedimientos operativos estándar.

κ-ELISA

Para determinar si los hibridomas que resultan de la fusión, generan anticuerpos humanos, se realizó un k-ELISA. Las placas de ELISA se recubrieron con anticuerpo de rata anti-cadena ligera κ de IgG humana (DAKO) diluido 1/10000 en PBS mediante incubación durante la noche a 4°C. Tras vaciar los pocillos, las placas se bloquearon mediante la incubación con PBSTC durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras esto, los pocillos se incubaron con sobrenadante de cultivo de hibridoma, diluido 1/2 en PBSTC. Se utilizó medio de cultivo diluido 1/2 en PBSTC como control negativo y se utilizó como control positivo el suero positivo de ratón de la cadena ligera κ diluido 1/100 en PBSTC. Posteriormente, los pocillos se lavaron tres veces y se incubaron con F(ab')₂ de rata anti-IgG humano conjugado con HRP de (DAKO), diluido 1/2000 en PBSTC durante 1 h a 37°C. Los pocillos se lavaron tres veces y los ensayos se realizaron con solución ABTS® recién preparada (1 mg/ml) durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA) en la oscuridad. Se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de placas de ELISA.

Se prepararon los anticuerpos monoclonales 18 y 22.

Ejemplo 2

Determinación de la afinidad de los anticuerpos anti-IGF-IR hacia el IGF-IR

Instrumento: BIACORE® 3000

Chip: CM5

Acoplamiento: acoplamiento de amina

Tampón: HBS (HEPES, NaCl), pH 7,4, 25°C

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

TABLA 1

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

Ejemplo 3

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

Materiales y Métodos

Las células NCI H322M se cultivaron en medio RPMI sobre cubreobjetos de vidrio de grado óptico a baja densidad o superconfluente para estudiar los efectos sobre la expresión en superficie de IGF-IR. En paralelo, el tejido de xenoinjerto de H322M aislado del grupo control (ratones no tratados) se congeló de forma instantánea en isopentano y se cortaron criosecciones de un espesor de 5 μm . El marcaje con inmunofluorescencia se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón anti IGF-IR (αIR3 , 5 $\mu\text{g/ml}$) o un anticuerpo de acuerdo con la invención, seguido de un anticuerpo de cabra anti-ratón o un anticuerpo de cabra anti-ratón marcado con Cy3 (Amersham Biosciences, GB) o Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes, Inc., USA). Las muestras se fotografiaron en un microscopio confocal Leica SP2 o se analizaron mediante FACS.

Resultados

Cuando las células H322M cultivadas a alta densidad se fotografiaron mediante microscopía confocal, fue evidente que el IGF-IR se agrupaba específicamente en los lugares de contacto célula-célula. Cuando se compara con el crecimiento de las células H322M *in vivo*, por ejemplo, en tejido de xenotrasplante, existe una fuerte similitud con los cultivos *in vitro* densamente empaquetados al menos en lo que se refiere a la organización de los receptores de IGF-I en superficie.

La regulación positiva del receptor de IGF-I en superficie en cultivos superconfluentes de las células H322M también se cuantificó mediante FACS. La expresión del receptor de IGF-I en superficie aumentó más de 10 veces cuando las células se cultivaron bajo condiciones de alta densidad en comparación con las condiciones de baja densidad sin contactos célula-célula significativos.

Otras células tumorales como las HT29, MDA231 y MCF-7 mostraron un comportamiento similar, indicando que la regulación positiva de los receptores de IGF-I en la superficie celular tras establecer los lugares de contacto célula-célula no es una característica única de las células H322M sino que parece ser una propiedad general de una organización más similar a tejido que también se encuentra *in vivo* (Fig. 1).

Ejemplo 4

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

Las células H322M se cultivaron en medio RPMI1640/FCS al 0,5% sobre placas cubiertas con poli-HEMA (poli(2-hidroxietilmetacrilato)) para prevenir la adherencia a la superficie plástica. Bajo estas condiciones, las células H322M forman esferoides densos que crecen de forma tridimensional (una propiedad que se denomina independencia de anclaje). Estos esferoides se parecen mucho a la histoarquitectura tridimensional y a la organización de tumores sólidos *in situ*. Los cultivos esferoides se incubaron durante 5 días en presencia de cantidades incrementales de anticuerpos entre 0-240 nM. El ensayo de conversión WST se utilizó para medir la inhibición de crecimiento. Cuando los cultivos esferoides de H322M se trataron con concentraciones diferentes de anticuerpo 18 (1-240 nM), se pudieron observar una inhibición dependiente de dosis en el crecimiento (Fig. 2).

Ejemplo 5

Inhibición del crecimiento de células tumorales H322M que expresan IGF-IR en cultivo 3D (ensayo de formación de colonias)

Las células H322M se cultivaron en medio RPMI1640/ NCS al 10% sobre placas cubiertas con poli-HEMA para prevenir la adherencia a la superficie plástica. Bajo estas condiciones, las células H322M forman esferoides densos que crecen de forma tridimensional (una propiedad que se denomina independencia de anclaje). Estos esferoides representan la histoarquitectura tridimensional y la organización de tumores sólidos *in situ*. Los cultivos esferoides se incubaron durante 5-10 días en presencia de cantidades incrementales de anticuerpos entre 0-7,5 $\mu\text{g/ml}$. El anticuerpo monoclonal <HBV> se utilizó como control negativo. Las colonias se fotografiaron en un microscopio invertido (Zeiss Axiovert) utilizando un contraste de fase y se contó utilizando un sistema de captura de imágenes automatizado (MetaMorph). Cuando los cultivos de esferoides de H322M se trataron con diferentes concentraciones (0,5-7,5 $\mu\text{g/ml}$) de anticuerpo 18, se pudo observar una inhibición dependiente de dosis en el crecimiento, mientras que el anticuerpo control <HBV> tuvo poco efecto o ninguno. Tanto el número como el tamaño de las colonias se redujo claramente en los cultivos tratados con 7,5 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo 18 (Fig. 3).

El análisis cuantitativo de las colonias mayores de 100 μm de diámetro reveló que el número de colonias se redujo en cerca de un 66% en los cultivos tratados con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo 18 (Fig. 4).

Ejemplo 6

Inhibición de la unión de IGF-I y IGF-II a las células tumorales que expresan IGF-IR

- 5 Para poder determinar la capacidad del anticuerpo de la invención para bloquear la unión de los ligandos IGF-I e IGFII al receptor de IGF-I (IGF-IR), se realizaron experimentos de competición con péptidos ligando marcados radiactivamente.

10 Las células tumorales humanas (HT29, NCI H322M, 0,5 a 1 x 10⁵/ml) se plaquearon en medio RPMI 1640 (PAA, N° de Cat. E15-039) suplementado con L-Glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 1x (Gibco, N° de Cat. 11140-035), piruvato sódico 1 mM (Gibco, N° de Cat. 11360-039) y FCS al 10% inactivado con calor (PAA, N° de Cat. A15-771). Se inocularon seis botellas en el formato T175 con 20 ml de células en los correspondientes medios para cada experimento y se cultivaron durante dos días a 37°C y CO₂ al 5% para obtener monocapas de células confluentes.

- 15 Para recoger células individuales, se añadieron 2 ml de 1x Tripsina/EDTA (Gibco, N° de Cat. 25300-054) por frasco de T175 y la separación de las células se monitorizó con un microscopio Zeiss Axiovert25. Las células se recogieron y se añadió medio con FCS al 10% como se ha descrito antes hasta un volumen total de 50 ml. Las células se reaclaron mediante centrifugación durante 10 minutos a 1000 rpm (Heraeus sepatech, Omnifuge 2,0 RS) y se resuspendieron en 50 ml de tampón de unión (NaCl 120 mM, KCl 5 mM, MgSO₄ 1,2 mM, EDTA 1 mM, D(+)-glucosa 10 mM, NaAc 15 mM, Hepes 100 mM pH 7,6, BSA 1%). Las células se contaron, se reaclaron mediante centrifugación y se ajustó con tampón de unión hasta 1 x 10⁶ células/ml.

- 20 Los péptidos IGF-I y IGF-II marcados con I¹²⁵ (Amersham, ~2000 Ci/mmol, N° de Cat. IM172 y IM238), solubilizados en CH₃COOH al 0,1%, se diluyeron en tampón de unión hasta una actividad final de 4 x 10⁵ cuentas/(minuto x ml). Se añadieron 75 µl de anticuerpo en las concentraciones especificadas junto con 25 µl de péptido IGF-I o IGF-II marcados con I¹²⁵ prediluidos a 200 µl de suspensión celular y se incubaron durante 3,5 h a 4°C. Las células se reaclaron mediante centrifugación durante 5 minutos a 2000 rpm (Eppendorf, 5415C) y se eliminó el sobrenadante. Tras lavar dos veces en 1 ml de tampón de unión, las células se resuspendieron en 1 ml de tampón de unión y se transfirieron a tubos de centelleo. La cantidad de péptido radioactivo unido a los receptores de superficie celular se midió en un contador de centelleo.

- 30 Las curvas de CI₅₀ resultantes, que demostraron la capacidad del anticuerpo para inhibir la unión de los péptidos IGF-I e IGF-II al receptor de IGF-I, se muestran en las Figs. 5 y 6. El valor medio de CI₅₀ para el anticuerpo 18 es 0,3 nM. Los resultados para el anticuerpo αIR3 se muestran en la Fig. 7. No pudo observarse inhibición detectable para la unión de IGF-II.

Ejemplo 7

Ensayo de competición de anticuerpo para la unión al IGF-IR

- 40 Para realizar un mapeo de epítomos de anticuerpos monoclonales anti-IGF-IR, se seleccionó un formato similar al de la medición de afinidad (Ejemplo 2), pero el IGF-IR se preincubó durante al menos 0,5 horas a TA con el anticuerpo en solución. Esta mezcla se inyectó y se detectó la unión de IGF-IR (o inhibición). Este ensayo permite la medición de la actividad inhibidora recíproca de los anticuerpos monoclonales para la unión al IGF-IR. Se encontró que los anticuerpos de la invención compiten por la unión al IGF-IR con αIR3, que es un anticuerpo que se sabe que se une a los aa 217-274 (Gustafson, T.A., y Rutter, W.J., J. Biol. Chem. 265 (1990) 18663-18667).

Ejemplo 8

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

Para poder determinar la capacidad del anticuerpo de la invención de inhibir la activación y fosforilación del receptor de IGF-I (IGF-IR), se realizaron experimentos de competición con el péptido IGF-I y el posterior análisis de Western blot con anticuerpos específicos para la tirosina fosforilada.

- 55 Las células tumorales humanas (HT29, NCI H322M, 5 x 10⁴/ml) se plaquearon en medio RPMI 1640 (PAA, N° de Cat. E15-039) suplementado con L-Glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 1x (Gibco, N° de Cat. 11140-035), piruvato sódico 1 mM (Gibco, N° de Cat. 11360-039) y FCS al 0,5% inactivado por calor (PAA, N° de Cat. A15-771). Para la determinación de los valores de CI₅₀, se inocularon placas de 12 pocillos con 1 ml de células en el medio correspondiente para cada experimento y se cultivaron durante dos días a 37°C y CO₂ al 5%.

- 60 Tras 48 horas de cultivo con medio bajo en suero, el suero se eliminó cuidadosamente y se sustituyó por medio con diferentes concentraciones de anticuerpo diluido. Tras 5 minutos de incubación a 37°C y CO₂ al 5%, se añadió el péptido de IGF-I a una concentración final de 2 nM y las células se incubaron de nuevo durante 10 minutos bajo las condiciones mencionadas anteriormente. El medio se eliminó cuidadosamente mediante aspiración y se añadió 100 µl de tampón de lisis frío por pocillo (Hepes 50 mM pH 7,2, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, glicerol al 10%, Triton®-X100 al 1%, NaF 100 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM, inhibidor de proteasa Complete®). Las células se despegaron utilizando un raspador celular (Corning, N° de Cat. 3010) y el contenido de los pocillos se transfirió a tubos de

reacción Eppendorf. Los fragmentos celulares se eliminaron por centrifugación durante 10 minutos a 13000 rpm y 4°C y la mitad del sobrenadante se añadió a tampón de muestras de Laemmli 2x en una proporción 1:1 (v/v). Para la inmunoprecipitación de IGF-IR, el resto de sobrenadante de los lisados celulares se sometió a una centrifugación de clarificado (10 minutos a 13000 rpm y 4°C) justo después se añadió 1 µl de un anticuerpo policlonal anti IGF-IRβ (C-20, Santa Cruz Biotechnologies) o un anticuerpo monoclonal murino (IgG1) que reconoce un epítipo entre los aminoácidos 440-586 del dominio extracelular (cadena α) del receptor humano de IGF de tipo 1 (mAb 24-55, GroPep). Tras 2 horas de incubación a 4°C en un tubo de reacción Eppendorf rotatorio, se añadió 25 µl de cuentas de Proteína G Sepharose® (Amersham Biosciences, N° de Cat. 17-0618-01) seguido de otro paso de incubación de 1 hora a 4°C. Las cuentas con complejos de anticuerpo-proteína unido se aislaron por centrifugación (1 minuto a 2000 rpm y 4°C) y se lavaron tres veces con tampón de lavado (tampón de lisis con solo Triton®-X100 al 0,1%). Tras hervir las cuentas en tampón de muestras de Laemmli, las proteínas celulares se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN® BA 85, Schleicher&Schuell) mediante Western blot semi seco.

Un anticuerpo específico de fosfotirosina (Upstate, clon 4G10, N° de Cat. 05-321) se utilizó para determinar el estado de fosforilación del IGF-IR inmunopurificado. Para la detección de Akt/PKB fosforilado, se aplicó un anticuerpo con especificidad para la Ser473 fosforilada (Cell Signalling, N° de Cat. 9271).

El bloqueo de la fosforilación observado de ambos IGF-IR y Akt/PKB inducido por IGF-I se muestra en la Fig. 8.

Ejemplo 9

Inducción in vitro de regulación negativa de IGF-IR mediada por anticuerpo

Para poder detectar los efectos del anticuerpo de la invención sobre la cantidad de receptores de IGF-I (IGF-IR) en células tumorales, se realizaron experimentos con seguimiento a lo largo del tiempo y un posterior análisis por western blot con anticuerpos específicos de IGF-IR.

Las células tumorales humanas (HT29, 5 x 10⁴ células/ml) se plaquearon en medio RPMI 1640 (PAA, N° de Cat. E15-039) suplementado con L-Glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 1x (Gibco, N° de Cat. 11140-035), piruvato sódico 1 mM (Gibco, N° de Cat. 11360-039) y FCS al 10% inactivado por calor (PAA, N° de Cat. A15-771). Para cada periodo de incubación se inoculó una placa de 12 pocillos con 1 ml de células en el correspondiente medio para cada experimento y se cultivó durante 24 horas a 37°C y CO₂ al 5%.

El medio se eliminó cuidadosamente y se sustituyó por medio con diferentes concentraciones de anticuerpo diluido. En dos pocillos control, el medio se sustituyó por medio sin anticuerpo o medio con un anticuerpo control (AB-1, Oncogene, N° de Cat. GR11). Las células se incubaron a 37°C y CO₂ al 5% y las placas individuales se retiraron para un posterior procesamiento tras 15 minutos, 24 horas y 48 horas.

El medio se eliminó cuidadosamente por aspiración y se añadió 100 µl de tampón de lisis frío por pocillo (Hepes 50 mM pH 7,2, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, glicerol 10%, Triton®-X100 1%, NaF 100 mM, 10 mM Na₄P₂O₇, inhibidor de proteasa Complete®). Las células se despegaron utilizando un raspador celular (Corning, N° de Cat. 3010) y el contenido de los pocillos se transfirió a tubos de reacción Eppendorf. Los fragmentos celulares se eliminaron por centrifugación durante 10 minutos a 13000 rpm y 4°C y el sobrenadante se añadió a tampón de muestras de Laemmli 2x en una proporción 1:1 (v/v). Las proteínas celulares se separaron mediante SDS PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN® BA 85, Schleicher&Schuell, N° de Cat. 10 401196) mediante western blot semi seco.

Se utilizó un anticuerpo específico para IGF-IR (C-20, Santa Cruz Biotechnologies, N° de Cat. sc-713) para determinar los niveles de proteína de IGF-IR.

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

Ejemplo 10

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

Para poder determinar si el anticuerpo de la invención también bloquea la unión de la insulina al receptor de la insulina (IR), se realizaron experimentos de competición con un péptido ligando marcado radiactivamente.

Las células 3T3 (1 x 10⁵/ml) que expresan de forma recombinante un gran número (> 10⁵) de IR humano se plaquearon en medio MEM de Dulbecco (DMEM) con mucha glucosa (PAA, N° de Cat. E15-009) suplementado con L-Glutamina 2 mM (Gibco, N° de Cat. 25030-024) y FCS al 10% inactivado por calor (PAA, N° de Cat. A15-771). Se inocularon seis botellas en el formato T175 con 20 ml de células en el medio correspondiente para cada experimento y se cultivaron durante dos días a 37°C y CO₂ al 5% para obtener monocapas celulares confluentes.

Para recoger células individuales, se añadieron 2 ml de 1x Tripsina/EDTA (Gibco, N° de Cat. 25300-054) por frasco de T175 y el despegue de las células se monitorizó con un microscopio. Las células se recogieron y se añadió

medio con FCS al 10% tal como se ha descrito antes en un volumen total de 50 ml. Las células se reislaron mediante centrifugación durante 10 minutos a 1000 rpm y se resuspendieron en 50 ml de tampón de unión (NaCl 120 mM, KCl 5 mM, MgSO₄ 1,2 mM, EDTA 1 mM, D(+)glucosa 10 mM, NaAc 15 mM, Hepes 100 mM pH 7,6, BSA al 1%). Las células se contaron, se reislaron mediante centrifugación y se ajustaron con tampón de unión a 1×10^6 células/ml.

El péptido de insulina marcado con I¹²⁵ (Amersham, N° de Cat. IM166, ~2000 Ci/mmol), solubilizado en CH₃COOH al 0,1%, se diluyó en tampón de unión hasta una actividad final de 4×10^5 cuentas/(minuto*ml). Se añadieron 75 µl de anticuerpo junto con 25 µl de péptido de insulina marcado con I¹²⁵ prediluido a 200 µl de suspensión celular (concentración final de anticuerpo 200 nM) y se incubó durante 3,5 h a 4°C. Las células se reislaron mediante centrifugación durante 5 minutos a 2000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Tras lavar dos veces en 1 ml de tampón de unión, las células se resuspendieron en 1 ml de tampón de unión y se transfirieron a tubos de centelleo. La cantidad de péptido radioactivo unido a los receptores de la superficie celular se midió en un contador de centelleo.

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

Ejemplo 11

No estimulación de la fosforilación de IGF-IR y Akt/PKB

Para poder excluir las actividades estimuladoras del anticuerpo de la invención sobre el IGF-IR, se determinó la fosforilación del IGF-IR en ausencia del ligando IGF-I pero en presencia del anticuerpo de la invención y un anticuerpo de referencia (αIR3, Oncogene, Alemania). Esta se realizó mediante un análisis western blot con anticuerpos específicos para el estado de fosforilación. Las células 3T3 (ATCC CRL 1658) transfectadas con IGF-IR (5×10^4 células/ml, Pietrkowski, Z., *et al.*, cell Growth Differ. 4 (1992) 199-205) se plaquearon en medio MEM de Dulbecco (DMEM) con mucha glucosa (PAA, N° de Cat. E15-009) suplementado con L-Glutamina 2 mM (Gibco, N° de Cat. 25030-024) y FCS al 0,5% inactivado por calor (PAA, N° de Cat. A15-771) o células tumorales humanas (HT29, NCI H322M, 5×10^4 /ml) en medio RPMI 1640 (PAA, N° de Cat. E15-039) suplementado con L-Glutamina 2 mM, 1x aminoácidos no esenciales (Gibco, N° de Cat. 11140-035), piruvato sódico 1 mM (Gibco, N° de Cat. 11360-039) y FCS al 0,5% inactivado por calor (PAA, N° de Cat. A15-771). Para la determinación de los valores de CI₅₀, se inocularon placas de 12 pocillos con 1 ml de células en el correspondiente medio para cada experimento y se cultivaron durante dos días a 37°C y CO₂ al 5%.

Tras 48 horas de cultivación con medio bajo en suero, el medio se eliminó cuidadosamente y se sustituyó por diferentes concentraciones de anticuerpo diluido en el medio correspondiente. Las células se incubaron durante 15 minutos bajo las condiciones mencionadas anteriormente. El medio se eliminó cuidadosamente por aspiración y se añadió 100 µl de tampón de lisis frío por cada pocillo (Hepes 50 mM pH 7,2, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, glicerol al 10%, Triton-X100 al 1%, NaF 100 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM, inhibidor de proteasa Complete™). Las células se despegaron utilizando un raspador celular (Corning, N° de Cat. 3010) y el contenido de los pocillos se transfirió a tubos de reacción Eppendorf. Los fragmentos celulares se eliminaron por centrifugación durante 10 minutos a 13000 rpm y 4°C (centrífuga Eppendorf 5415R) y la mitad del sobrenadante se añadió a tampón de muestras de Laemmli 2x en una proporción 1:1 (v/v). Para la inmunoprecipitación de IGF-IR, el resto de sobrenadante de los lisados celulares se sometió a una centrifugación de clarificado (10 minutos a 13000 rpm y 4°C) justo después se añadió 1 µl de un anticuerpo anti IGF-IR (C-20, Santa Cruz Biotechnologies, N° de Cat. sc-713 o mAb 24-55, GroPep, N° de Cat. MAD1). Tras 2 horas de incubación a 4°C en un tubo de reacción Eppendorf rotatorio, se añadió 25 µl de cuentas de Proteína G Sepharose® (Amersham Biosciences, N° de Cat. 17-0618-01) seguido de otro paso de incubación de 1 hora a 4°C. Las cuentas con complejos de anticuerpo-proteína unido se aislaron por centrifugación (1 minuto a 2000 rpm y 4°C) y se lavaron tres veces con tampón de lavado (tampón de lisis con solo Triton®-X100 al 0,1%). Tras hervir las cuentas en tampón de muestras de Laemmli, las proteínas celulares se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN® BA 85, Schleicher&Schuell, N° de Cat. 10 401196) mediante Western blot semi seco.

Se utilizó un anticuerpo específico de fosfotirosina (Upstate, clon 4G10, N° de Cat. 05-321, que reconoce proteínas con la tirosina fosforilada) para determinar el estado de fosforilación del IGF-IR inmunopurificado. Para la detección de Akt/PKB fosforilado, se aplicó un anticuerpo frente a Akt1 con especificidad para la Ser473 fosforilada (Cell Signalling, N° de Cat. 9271).

Se observó que la quinasa Akt/PKB corriente abajo en la ruta de señalización de IGF-IR estaba significativamente activada por el anticuerpo de referencia a concentraciones superiores a 5 nM pero no por el anticuerpo de la invención a concentraciones hasta 10.000 nM. Los resultados se muestran en las Figs. 10 y 11 (HM = medio bajo en suero con FCS al 0,5%, HM+IGFI = medio bajo en suero con FCS al 0,5% y hIGF-I 10 nM).

Ejemplo 12

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

Se injeraron tumores en ratones desnudos y se trataron una vez con diferentes concentraciones de anticuerpo de la invención. 24 horas después del tratamiento, se extrajeron los tumores y se homogeneizaron bajo nitrógeno líquido.

ES 2 317 020 T3

Se añadió tampón de lisis frío (Hepes 50 mM pH 7,2, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, glicerol al 10%, Triton-X100 al 1%, NaF 100 mM, Na_3VO_4 1 mM, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM, inhibidor de proteasa Complete™, PMSF 1 mM) en una proporción de volumen de tampón respecto al peso del tumor de 3:1 y se mezcló de forma intensa con el homogenado del tumor descongelado. Tras solubilizar el tejido durante 15 minutos en hielo, se eliminaron los fragmentos insolubles mediante centrifugación durante 10 minutos a 13000 rpm y 4°C (centrífuga Eppendorf 5415R). La concentración de proteína de las muestras se determinó con los reactivos Micro BCA™ de (Pierce) y se añadió el tampón de lisis para ajustar a concentraciones iguales. Parte del sobrenadante se añadió al tampón de muestras 2x de Laemmli en una proporción 1:1 (v/v). Las proteínas celulares se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN BA 85, Schleicher&Schuell, N° de Cat. 10 401196) mediante western blot semiseco. Se utilizó un anticuerpo específico de IGF-IR (C-20, Santa Cruz Biotechnologies, N° de Cat. sc-713) para detectar el IGF-IR.

Tras el tratamiento con el anticuerpo de la invención, se observó una concentración dependiente de la disminución de los niveles de IGF-IR con una CE_{50} estimada a 0,6 mg/kg (Figura 12).

Ejemplo 13

ELISA de unión a C1q

Introducción

Para determinar la capacidad de los anticuerpos de acuerdo con la invención de fijar C1q, se utilizó un ensayo de ELISA. C1q es parte del sistema inmunitario adquirido y, tras la unión a complejos inmunes, dispara la activación secuencial de varios zimógenos. Las enzimas a su vez, provocan la escisión de moléculas C3, que pueden resultar en la activación de reacciones inflamatorias, opsonización de partículas extrañas o aberrantes y lisis de las membranas celulares.

En principio, la placa de ELISA se recubre con rangos de concentración del anticuerpo, al que se le añade C1q humano. La unión de C1q se detecta mediante un anticuerpo dirigido frente a C1q humano seguido del conjugado de peroxidasa marcado.

Materiales y métodos

Los anticuerpos 18, 8 y 23 y los anticuerpos control se probaron en concentraciones de 10, 5, 1 y 0,5 $\mu\text{g/ml}$. La Tabla 1 muestra las especificidades de las muestras probadas. Como control negativo se utilizó un IgG4 humano (CLB, reserva de 0,5 $\mu\text{g/ml}$), que se une a C1q de forma muy débil. La IgG1 humana se incorporó como control positivo. Se utilizó la solución de reserva del C1q humano con una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$. Para la detección de C1q se utilizó un anticuerpo de conejo dirigido contra C1q (Dako) y un anticuerpo anti IgG de conejo, conjugado con peroxidasa de rábano picante (Sigma).

Cálculos y ajuste de curvas

Los cálculos referentes a la unión máxima (B_{max}) del HuMAb ensayado se determinó utilizando un ajuste de la curva de regresión no lineal (unión de un sitio) utilizando un programa Graphpad Prism.

Resultados

Los anticuerpos de acuerdo con la invención muestran una unión a la proteína C1q humana dependiente de la dosis. La densidad óptica a 405 nm ($\text{DO}_{405 \text{ nm}}$) se representó frente a las concentraciones de HuMAb y las curvas se ajustaron utilizando una regresión no lineal. Los valores con mejor ajuste a la unión máxima (B_{max}) se enumeran en la Tabla 2, así como el coeficiente de correlación de la curva (R^2) y la desviación estándar para cada valor. El menor coeficiente de correlación presenta un valor de 0,950 (IgG4). Con una unión máxima de 0,279, el IgG4 humano (control negativo) muestra la unión mínima de C1q. Los controles positivos IgG1 y IgG3 se unen a C1q, como muestra su unión máxima de 1,729 y 2,223, respectivamente.

TABLA 2

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

El coeficiente de correlación (R²) y la desviación estándar también se registran.

En comparación con la unión a C1q del IgG4 humano (control negativo, con una D.O. de 0,279), todos los anticuerpos probados son igualmente capaces de fijarse a C1q.

Ejemplo 14

Determinación de las funciones efectoras mediadas por anticuerpo mediante HuMAbs anti-IGF-IR

Para poder determinar la capacidad de los anticuerpos HuMAb generados para discernir los mecanismos inmuno efectores, se realizaron estudios de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

Para estudiar la CDC (National Cancer Institute, se marcaron las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón), H322M, H460 y células NIH 3T3 ($2-6 \times 10^6$) con $100 \mu\text{Ci}$ de ^{51}Cr durante 45-120 minutos (Amersham Pharmacia Biotech, UK, Cat CJS11). Tras marcar las células, éstas se lavaron dos veces con 40 ml de PBS y se centrifugaron durante 3 minutos a 1500 rpm. Las células se plaquearon entonces a 5.000 por pocillo en una placa de fondo redondeado, en un volumen de $50 \mu\text{l}$. Los anticuerpos se añadieron a una concentración final en el rango de 25-0,1 $\mu\text{g/ml}$ en un volumen de $50 \mu\text{l}$ de medio de cultivo celular a $50 \mu\text{l}$ de suspensión celular y se incubaron durante 30-60 minutos. Tras la incubación, se eliminó el exceso de anticuerpo mediante dos lavados con PBS. Se añadieron $100 \mu\text{l}$ de suero reunido humano, de cobaya, conejo o ratón desnudo activo o inactivo (30 minutos a 56°C) diluido entre 1/3-1/30, y las células se incubaron durante 3 horas, tras las cuales las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 minutos. Se separó $100 \mu\text{l}$ del sobrenadante, se transfirió a tubos de polipropileno y se contó en un contador g.

Para estudiar los efectos de los anticuerpos en la ADCC, se marcaron células H322M, H460 y NIH 3T3 u otras células adecuada que expresan IGF-IR ($2-6 \times 10^6$) con $100 \mu\text{Ci}$ ^{51}Cr durante 45-120 minutos (Amersham Pharmacia Biotech, UK, Cat CJS11), se lavaron dos veces con 40 ml de PBS y se centrifugaron durante 3 minutos a 1500 rpm. Las células se plaquearon a 5.000 por pocillo en una placa de fondo redondeado, en un volumen de $50 \mu\text{l}$. Los anticuerpos HuMAb se añadieron a una concentración final en el rango de 25-0,1 $\mu\text{g/ml}$ en un volumen de $50 \mu\text{l}$ de medio de cultivo celular a $50 \mu\text{l}$ de suspensión celular y se incubaron durante 15 minutos. Posteriormente, se añadieron $50 \mu\text{l}$ de células efectoras, PBMC recién aislados o células efectoras purificadas de la capa leucocitaria, en una proporción E:T en el rango de 100:1 a 5:1. Las placas se centrifugaron durante 2 minutos a 500-700 rpm, y se incubaron durante la noche a 37°C . Tras la incubación las células se centrifugaron durante 3 minutos a 1500 rpm y se recogieron $100 \mu\text{l}$ de sobrenadante, se transfirieron a tubos de polipropileno y se contaron en un contador g.

La magnitud de lisis celular mediante CDC o ADCC se expresó como % de la liberación máxima de radioactividad de las células diana lisadas por detergente corregido por la liberación espontánea de radioactividad de las correspondientes células diana.

Ejemplo 15

Inhibición del crecimiento de los tumores H322M

5 Los efectos del anticuerpo 18 *in vivo* se investigó mediante la inducción de tumores en ratones desnudos atímicos de acuerdo con los métodos establecidos. Las células H322M NSCLC humanas se coinyectaron junto con Matrigel por vía subcutánea en ratones desnudos atímicos de 6-7 semanas de edad (nu/nu). Para este propósito, se concentraron 5×10^6 células H322M en 100 μ l de medio de cultivo y se mezclaron con 100 μ l de Matrigel. Se inyectaron 200 μ l de esta mezcla en los costados derechos de los ratones. Se calculó el volumen del tumor mediante la medición de los

10 diámetros de los tumores con calibradores de Vernier dos veces a la semana de acuerdo con la fórmula publicada por primera vez por Geran *et al.* ("Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems", Cancer Chemother. Rep. 11,301, 1972) en la que el volumen del tumor [mg] = (longitud x (amplitud)²). El anticuerpo se administró por vía intraperitoneal (i.p.) a 10 ml/ kg. El tratamiento empezó con

15 dobles dosis del anticuerpo administrado en volumen doble. Los tumores se indujeron en ratones desnudos como se ha descrito antes. Después de que los tumores crecieran en un volumen medio de 160 mg, los ratones se trataron por vía intraperitoneal una vez a la semana seis veces con 6, 0,6 y 0,06 mg/ kg del anticuerpo como dosis consecutivas empezando con 12, 1,2 y 0,12 mg/ kg como dosis de carga, dada una vez el primer día de tratamiento. La Figura 13 muestra los volúmenes del tumor medidos durante el tratamiento hasta el día 67, cuando los animales se sacrificaron y el experimento terminó. El experimento demuestra que el bloqueo del eje IGF-IR mediante mAb 18 rhu anti-IGF-

20 IR resulta en eficacia antitumoral cuando se administra como agente único a 6 y 0,6 mg/kg. Por contra, a 0,06 mg/kg no presenta efectos sobre el crecimiento tumoral.

De forma adicional, se probó el anticuerpo 18 en combinación con gemcitabina en el mismo modelo. Los tumores se indujeron como se ha descrito antes y el tratamiento se inició cuando se establecieron los tumores y crecieron hasta

25 una media de 170 mm³ en todos los grupos. El anticuerpo se administró una vez a la semana i.p. a 6 y 0,6 mg/kg y en combinación con 62 mg/kg de gemcitabina a 0,6 mg. Se administró un ciclo de gemcitabina, es decir, cada tercer día hasta cuatro veces en total. De nuevo, el tratamiento comenzó administrando dosis dobles del anticuerpo. La Figura 14 muestra el tamaño del tumor en relación a los diferentes tratamientos a lo largo del tiempo. El experimento demostró que el tratamiento con anticuerpo 18 administrado una vez cada siete días inhibe el crecimiento tumoral por sí mismo

30 y aumenta la efectividad de la gemcitabina, que es un compuesto antimetabólico conocido.

Ejemplo 16

Inhibición del crecimiento de los tumores 3T3

35 Los tumores se indujeron en ratones desnudos esencialmente como se describe en el Ejemplo 15 excepto que se usaron fibroblastos 3T3 murinos que sobreexpresan el IGF-IR humano. Se trataron los ratones con tumores establecidos de aproximadamente 180 mg por vía intraperitoneal una vez a la semana siete veces con 18, 6 o 0,6 mg/kg de anticuerpo 18. De nuevo, el tratamiento comenzó administrando dosis dobles del anticuerpo administrando como dosis

40 de carga (36, 12 y 1,2 mg/kg). El experimento demuestra que mediante el tratamiento con el anticuerpo, el crecimiento tumoral puede retrasarse cuando se administra a 18 y 6 mg/kg una vez a la semana (Figura 15).

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para la selección de un anticuerpo frente a IGF-IR a partir de una diversidad de anticuerpos frente a IGF-IR que se **caracteriza** en que un ensayo de fosforilación celular utilizando células 3T3 que proporcionan entre 400.000 y 600.000 moléculas de IGF-IR por célula en un medio que contiene 0,5% de suero bovino fetal (FCS) inactivado por calor, se realiza con dichos anticuerpos y que dicho anticuerpo se selecciona si no muestra actividad estimuladora de IGF-IR que se mide como fosforilación de PKB a una concentración de 10 μ M cuando se compara con dicho ensayo sin dicho anticuerpo.

Fig.1

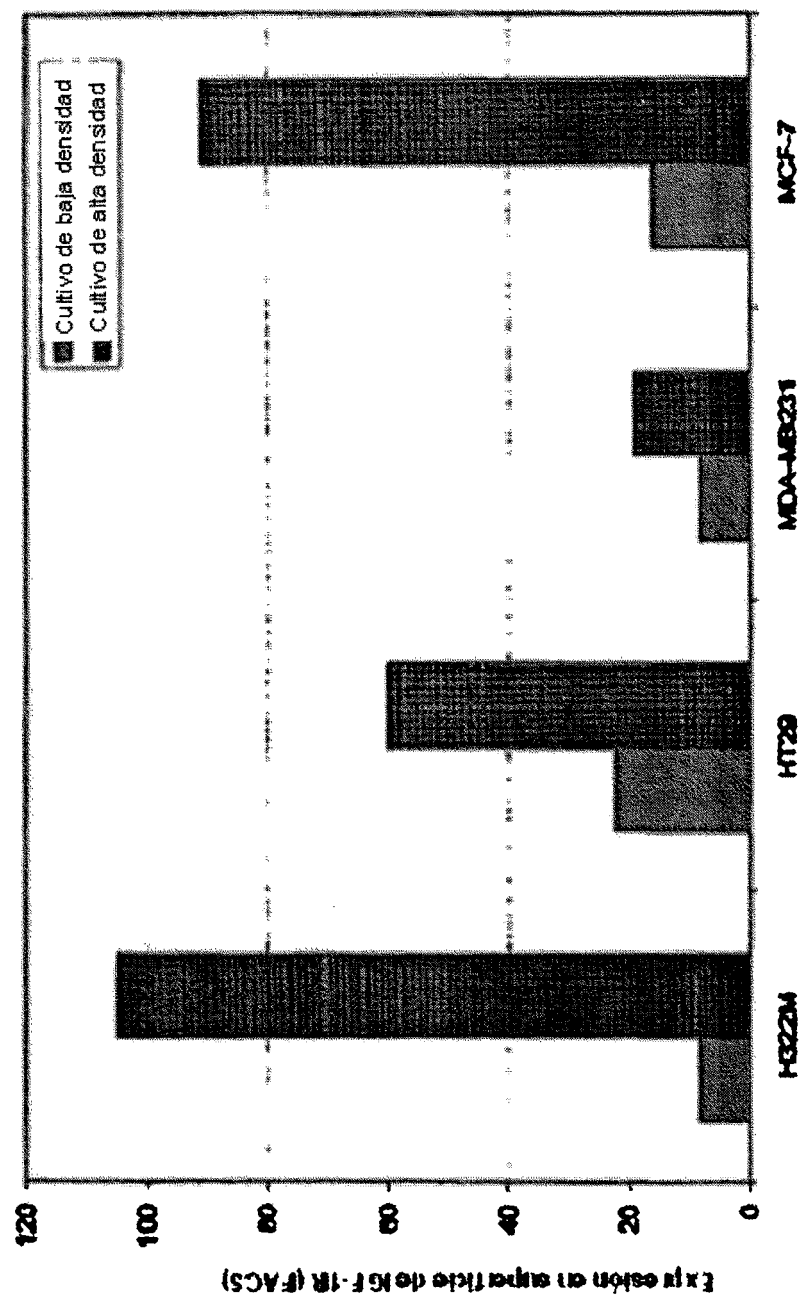


Fig.2

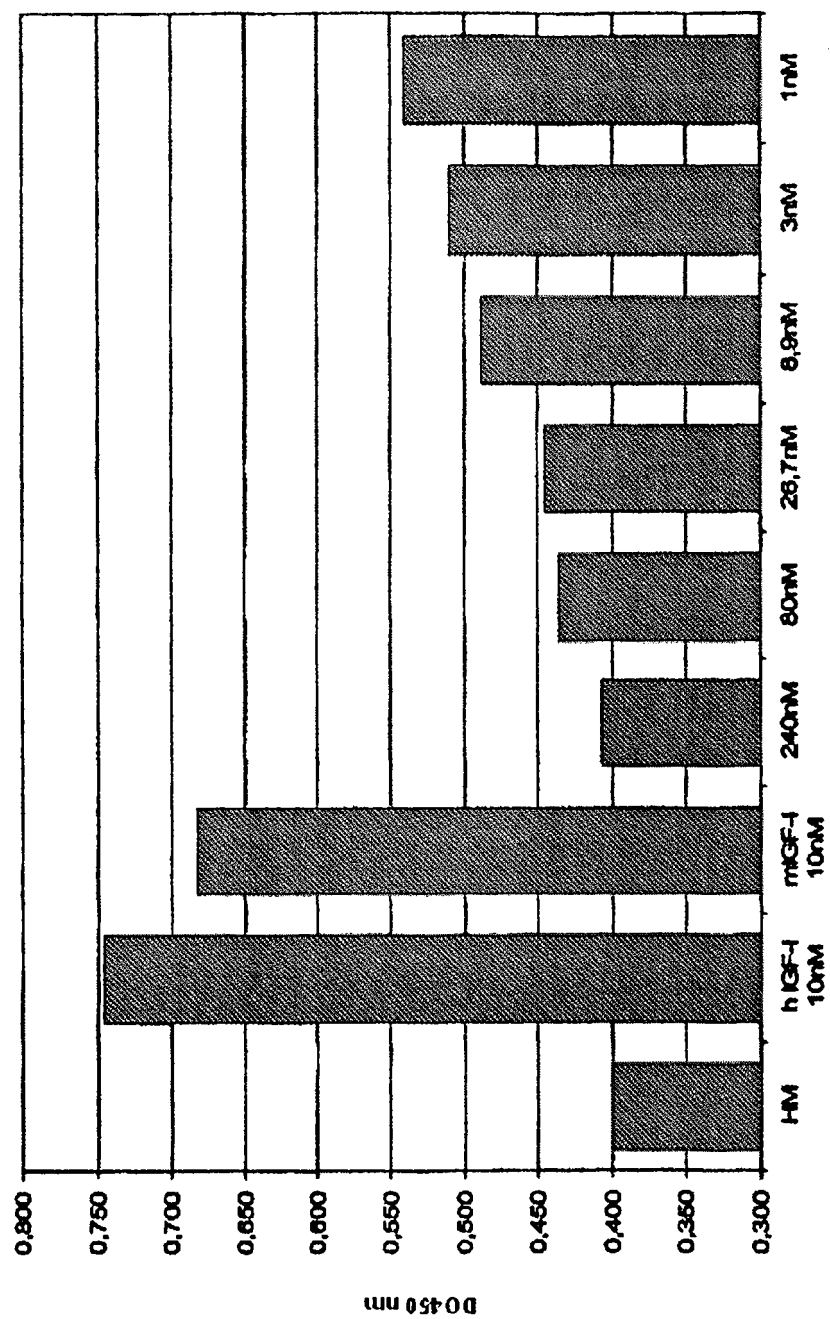


Fig.3

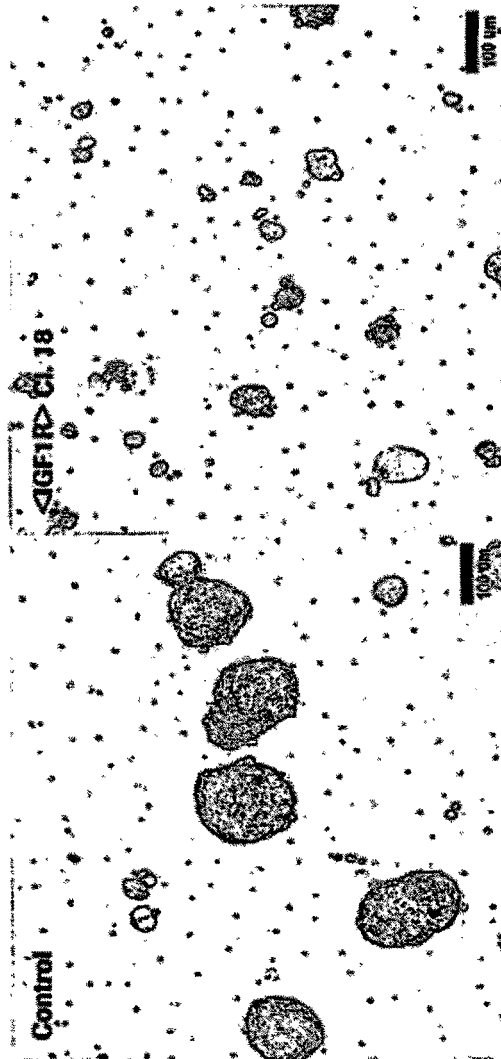


Fig.4

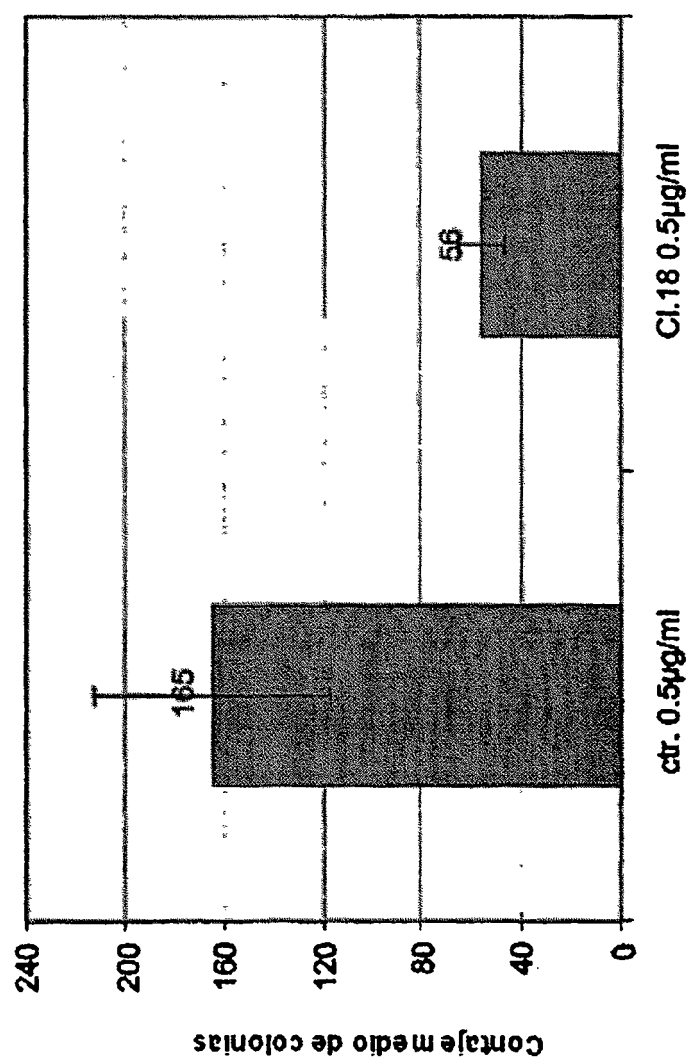


Fig.5

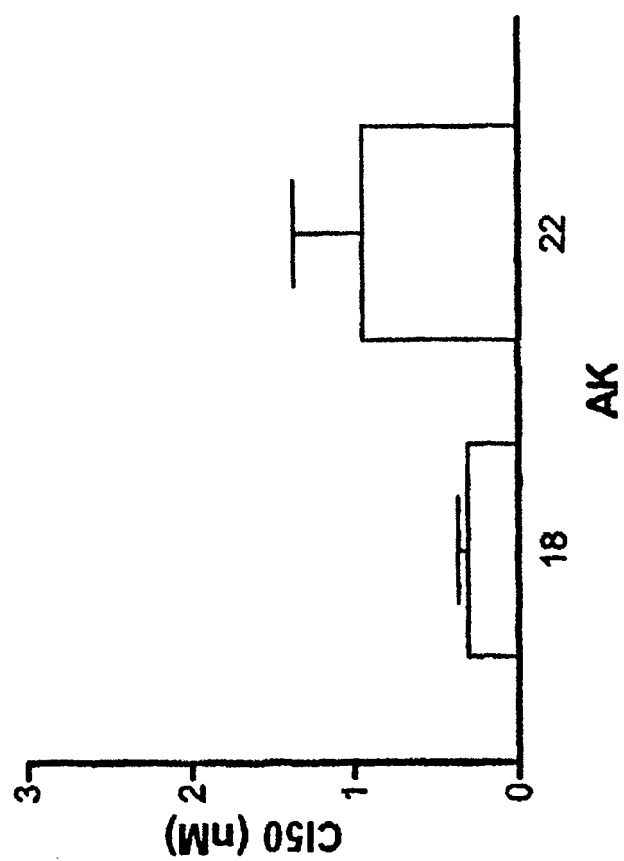


Fig.7

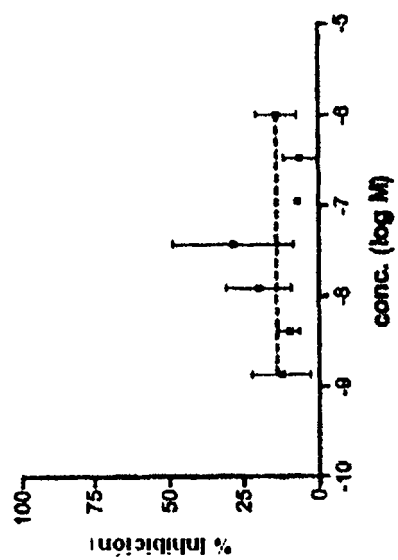


Fig.6

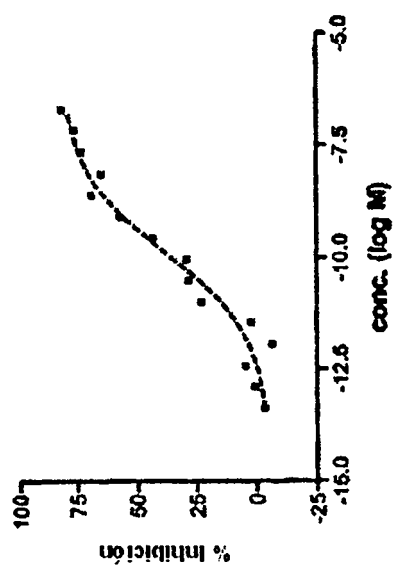


Fig.8

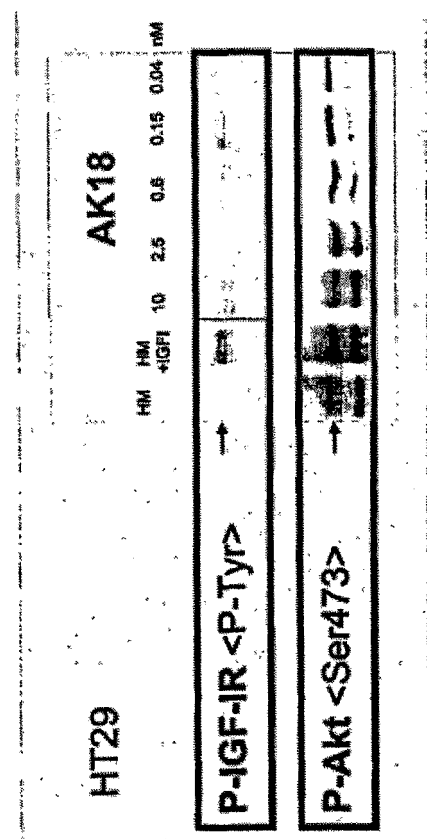


Fig.9

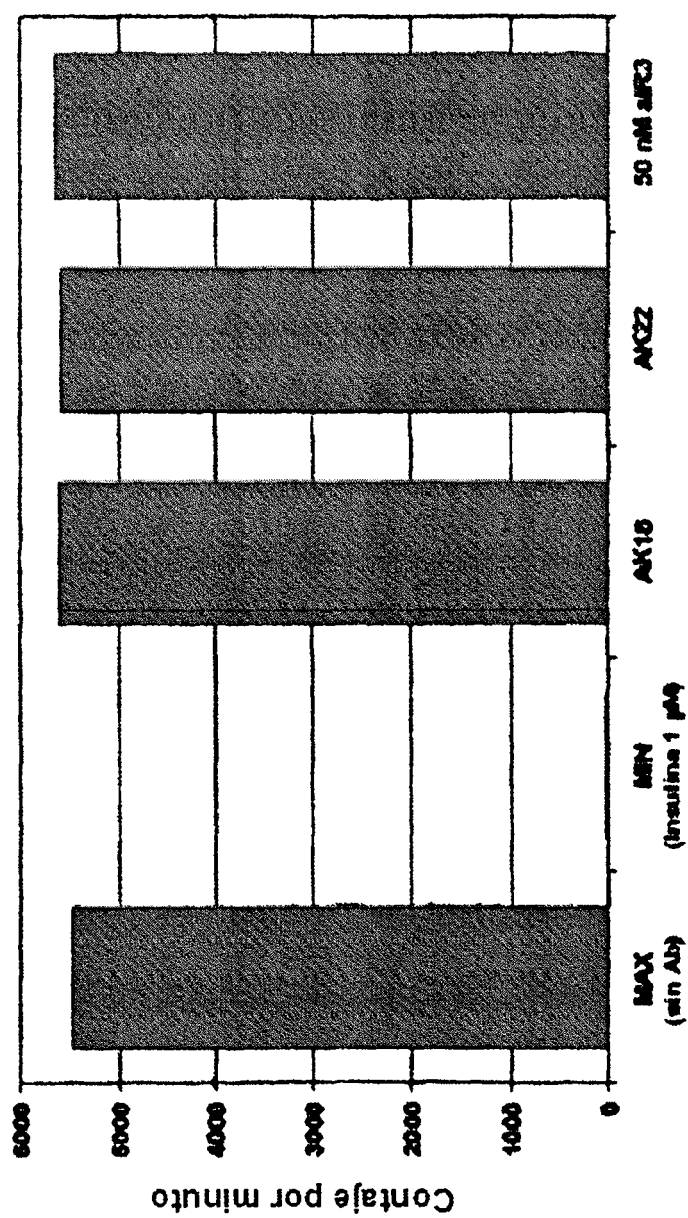


Fig.10

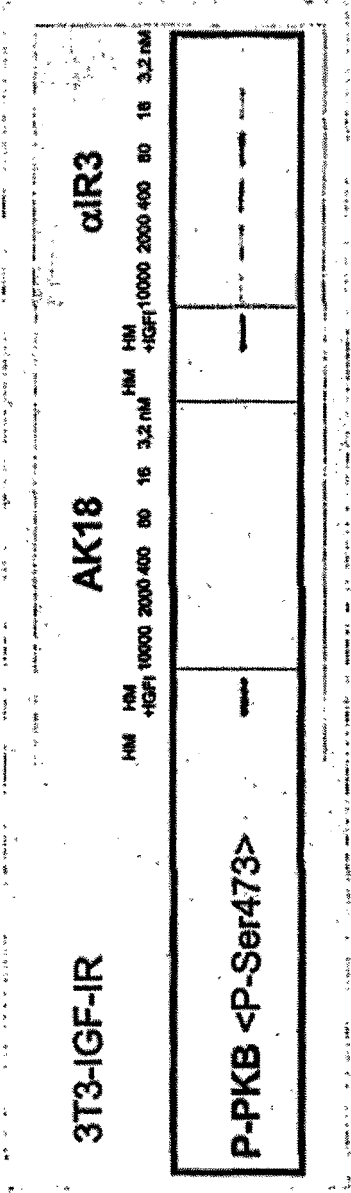


Fig.11

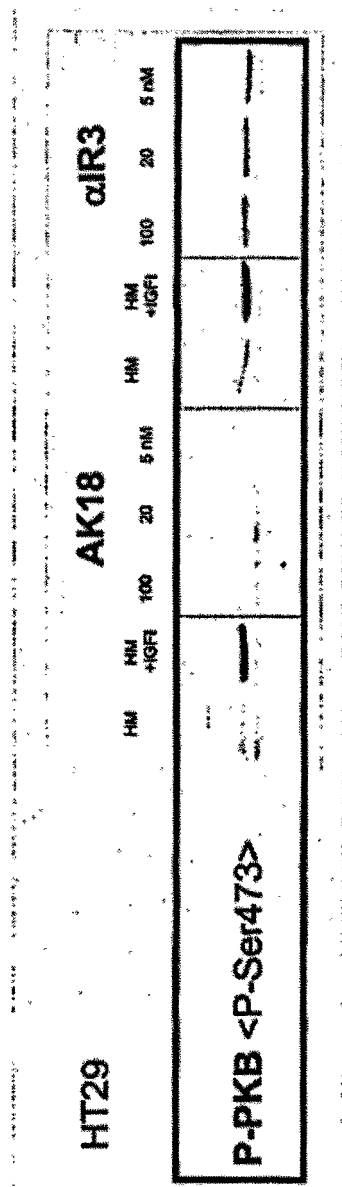


Fig.12






H322M xenoinjerto		vehículo	10 mg/kg	2.5 mg/kg	0.6 mg/kg	0.15 mg/kg
IGF-IR						

Fig. 13

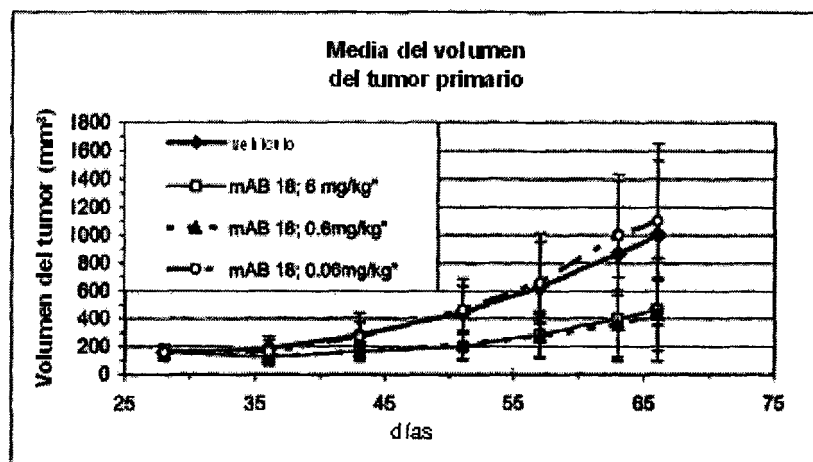


Fig. 14

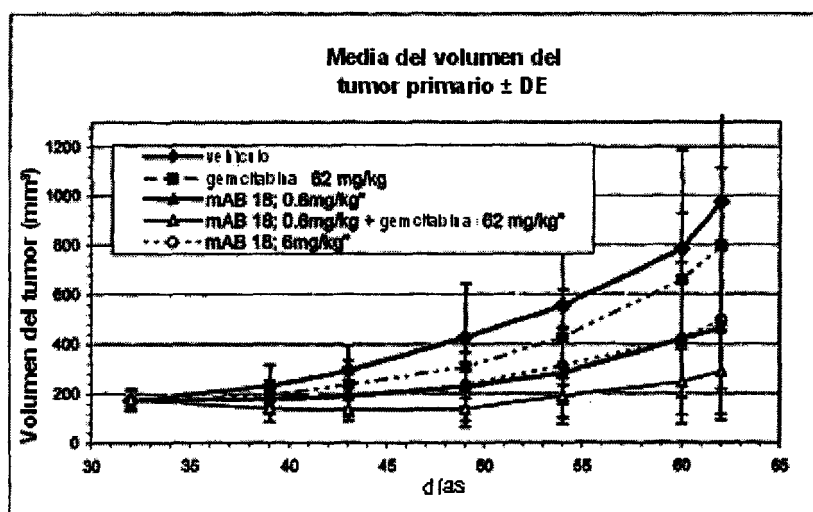
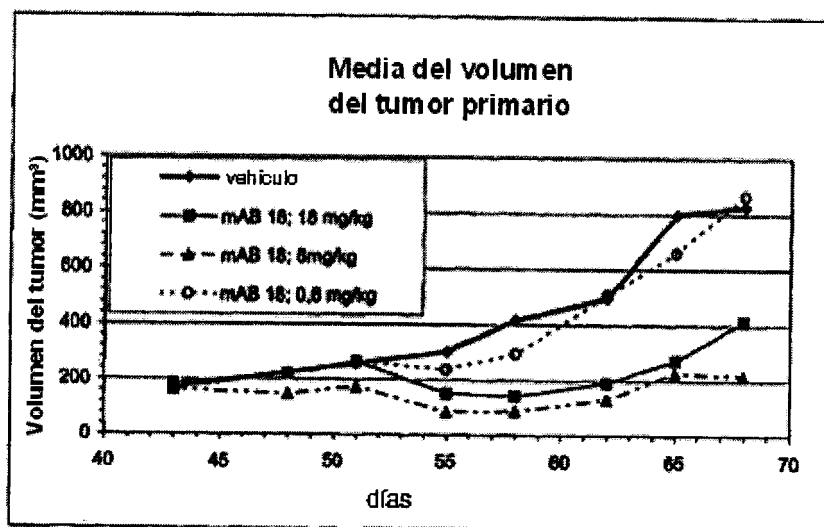


Fig. 15



ES 2 317 020 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche

<120> Anticuerpos frente al receptor del factor de crecimiento similar a la insulina I y utilización de los mismos

<130> 21695

<150> PE 03015526

<151> 2003-07-10

<160> 8

<170> PatentIn versión 3,2

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Ser Val Ser Ser
115

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 317 020 T3

<400> 2

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

<210> 3

40 <211> 118

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

45

50

55

60

65

ES 2 317 020 T3

<400> 3

5	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg	1	5	10	15
10	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr	20	25	30	
15	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met	35	40	45	
20	Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val	50	55	60	
25	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	65	70	75	80
30	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85	90	95	
35	Ala Arg Glu Leu Gly Arg Arg Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr	100	105	110	
40	Leu Val Thr Val Ser Ser	115			

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

50	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	1	5	10	15
55	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr	20	25	30	
60	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile	35	40	45	

65

ES 2 317 020 T3

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

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

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

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

<210> 5

<211> 990

<212> DNA

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(990)

<400> 5

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

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

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

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

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

ES 2 317 020 T3

	tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag	288
	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys	
	85 90 95	
5	aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc	336
	Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys	
	100 105 110	
10	cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca	384
	Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro	
	115 120 125	
15	aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc	432
	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys	
	130 135 140	
20	gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg	480
	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp	
	145 150 155 160	
25	tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag	528
	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	
	165 170 175	
30	gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg	576
	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu	
	180 185 190	
35	cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac	624
	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	
	195 200 205	
40	aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg	672
	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	
	210 215 220	
45	cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag	720
	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu	
	225 230 235 240	
50	ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat	768
	Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr	
	245 250 255	
55	ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac	816
	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn	
	260 265 270	
60	aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc	864
	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe	
	275 280 285	
65	ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac	912
	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn	
	290 295 300	
70	gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg	960
	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr	
	305 310 315 320	
75	cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa	990
	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
	325 330	

ES 2 317 020 T3

<210> 6

<211> 330

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

ES 2 317 020 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 7
<211> 321
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)

<400> 7

cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc cag cca tct gat gag 48
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc 96
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

ES 2 317 020 T3

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

25 <210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30
 <400> 8

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