



(12) PATENT

(19) NO

(11) 339935

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20056246	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2004.07.09 PCT/EP2004/07562
(22)	Inng.dag	2005.12.30	(85)	Videreføringsdag	2005.12.30
(24)	Løpedag	2004.07.09	(30)	Prioritet	2003.07.10, EP, 03015526
(41)	Alm.tilgj	2006.02.09			
(45)	Meddelt	2017.02.20			
(73)	Innehaver	River Vision Development Corp., One Rockefeller Plaza, Suite 1204, US-NY10020 NEW YORK, USA			
(72)	Oppfinner	Erhard Kopetzki, Kastnerhofstrasse 21, DE-82377 PENZBERG, Tyskland Ralf Schumacher, Hochfeldstrasse 78, DE-82377 PENZBERG, Tyskland Jan J G van de Winkel, Verlangde Slotslaan 80, NL-3707CK ZEIST, Nederland Paul Parren, Werdorperwaard 17, NL-3984PR ODIJK, Nederland Yvo Graus, Werdorperwaard 3, NL-3984PR ODIJK, Nederland Klaus-Peter Kuenkele, Karwendelstrasse 9, DE-83671 BENEDIKTBEUERN, Tyskland Olaf Mundigl, Tassiloring 16, DE-82362 WEILHEIM, Tyskland Frank Rebers, Adriaan Menninckwartier 34, NL-3554CT UTRECHT, Nederland Martine van Vugt, Fluweelmos 6, NL-3994KR HOUTEN, Nederland			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for seleksjonen av et antistoff mot IGF-IR			
(56)	Anførte publikasjoner	WO 02053596 A WO 03100008 A WO 03059951 A			
(57)	Sammendrag				

Et antistoff som binder til IGF-IR og inhiberer bindingen av IGF-I og IGF-II til IGF-IR som er karakterisert ved at nevnte antistoff er a) er av IgG1 isotype, b) oppviser en ratio for IC₅₀-verdier for inhibering av bindingen av IGF-I til IGF-IR til inhibering av binding av IGF-II til IGF-IR på 1:3 til 3: 1, c) inhiberer minst 80% ved en konsentrasjon på 5 nM IGF-IR-fosforylering i en cellulær fosforyleringsanalyse ved anvendelse av 3T3-celler under forutsetning av 400,000 til 600,000 molekyler IGF-IR pr. celle i et medium inneholdende 0,5% varmeinaktivert føtalt kalveserum (FCS) sammenlignet med en slik analyse uten nevnte antistoff, og d) oppviser ingen IGF-IR-stimulerende aktivitet målt som IGF-IR-fosforylering i en konsentrasjon på 10 nM i en cellulær fosforyleringsanalyse ved anvendelse av 3T3-celler under forutsetning av 400,000 til 600,000 molekyler IGF-IR pr. celle i et medium inneholdende 0,5% varmeinaktivert føtalt kalveserum (FCS) sammenlignet med en slik analyse uten nevnte antistoff har forbedrede egenskaper i antitumorterapi.



Foreliggende oppfinnelse angår fremgangsmåte for seleksjonen av et antistoff mot IGF-IR.

Insulinlignende vekstfaktor I-reseptor (IGF-IR, EC 2,7,112, CD 221 antigen) tilhører familien av transmembran proteintyrosinkinaser (LeRoith, D., et al., *Endocrin. Rev.* 16
 5 (1995) 143-163; og Adams, T.E., et al., *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1050-1063). IGF-IR binder IGF-I med høy affinitet og initierer den fysiologiske responsen til denne liganden *in vivo*. IGF-IR binder også til IGF-II, imidlertid med noe lavere affinitet. Overekspressjon av IGF-IR fremmer den neoplastiske transformasjonen av celler og det finnes belegg for at IGF-IR er involvert i malign transformasjon av celler og er derfor et anvendelig mål for
 10 utviklingen av terapeutiske midler for behandling av kreft (Adams, T.E., et al., *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1050-1063).

Antistoffer mot IGF-IR er velkjente på området og undersøkt for deres antitumor-effekter *in vitro* og *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. og 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. og 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. Comm.* 149 (1987) 276-281; og 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). Antistoffer mot IGF-IR er også beskrevet i mange andre ytterligere publikasjoner, f.eks. Arteaga, C.L.,

et al., *Breast Cancer Res. Treatment* 22 (1992) 101-106; og Hailey, J., et al., *Mol. Cancer Ther.* 1 (2002) 1349-1353.

Spesielt anvendes det monoklonale antistoffet mot IGF-IR betegnet α IR3 i stor grad i
5 undersøkelser med hensyn til å studere IGF-IR-medierte prosesser og IGF-I-medierte
sykdommer slik som kreft. Alfa-IR-3 ble beskrevet av Kull, F.C., *J. Biol. Chem.* 258
(1983) 6561-6566. I mellomtiden har det blitt publisert omtrent ett hundre publikasjoner
som angår undersøkelse og terapeutisk anvendelse av α IR3 med hensyn til dens antitumor-
effekt, alene og sammen med cytostatiske midler slik som doxorubicin og vinkristin. α IR3
10 er et murint monoklonalt antistoff som er kjent å hemme IGF-I-binding til IGF-reseptor
men ikke IGF-II-binding til IGF-IR. Ved høye konsentrasjoner stimulerer α IR3
tumorcelleproliferasjon og IGF-IR-fosforylering (Bergmann, U., et al., *Cancer Res.* 55
(1995) 2007-2011; Kato, H., et al., *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 2655-2661). Det finnes andre
antistoffer (f.eks. 1H7, Li, S.L., et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 49 (2000) 243-252)
15 som inhiberer IGF-II-binding til IGF-IR mer potent enn IGF-I-binding. En oppsummering
av teknikkens stand med hensyn til antistoffer og deres egenskaper og karakteristika er
beskrevet av Adams, T.E., et al., *Cell Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1050-1063.

De fleste antistoffene beskrevet på området stammer fra mus. Slike antistoffer er, hvilket er
20 velkjent på området, ikke anvendelige for behandling av humane pasienter uten ytterligere
endringer som dannelse av kimærer eller humanisering. Med grunnlag i disse ulempene, er
humane antistoffer klart foretrukket som terapeutiske midler ved behandling av humane
pasienter. Humane antistoffer er velkjente på området (van Dijk, M.A. og van de Winkel,
J.G., *Curr. Opin. Pharmacol.* 5 (2001) 368-374). Basert på slik teknologi kan humane
25 antistoffer mot mange forekjellige mål produseres. Eksempler på humane antistoffer mot
IGF-IR er beskrevet i WO 02/053596.

WO 03100008 A beskriver humant, nøytraliserende, monoklonale antistoffer mot human
insulinlignende vekstfaktor-reseptor-I (IGFR1). Antistoffene er nyttige for behandling eller
30 forhindring av cancer i et individ. Også inkludert er fremgangsmåter for anvendelse og
fremstilling av antistoffene ifølge oppfinnelsen.

WO 03059951 A beskriver nye antistoffer som er i stand til å bindes spesifikt til den humane insulinlignende vekstfaktor-I-reseptor (IGF-IR).

5 Imidlertid er det fortsatt et behov for antistoffer mot IGF-IR med overbevisende fordeler for pasienter med behov for antitumorterapi. Den relevante nytten for pasienten er, i enkle ordelag, reduksjon av tumorvekst og en betydelig forlengelse av tiden før progresjon foranlediget av behandling med antitumormidlet.

Oppsummering av oppfinnelsen

10 Oppfinnelsen omfatter Fremgangsmåte for seleksjonen av et antistoff mot IGF-IR.

Oppfinnelsen omfatter en fremgangsmåte for seleksjon av et antistoff mot IGF-IR fra en rekke antistoffer mot IGF-IR karakterisert ved at det utføres en cellulær
 15 fosforyleringsanalyse som anvender 3T3-celler under forutsetning av 400,000 til 600,000 molekyler IGF-IR pr. celle i et medium inneholdende 0,5% varmeinaktivert føtalt kalveserum (FCS) med nevnte antistoffer, og nevnte antistoff, som ikke oppviser noen IGF-IR-stimulerende aktivitet målt som PKB-fosforylering i en konsentrasjon på 10 µM sammenlignet med en slik analyse uten nevnte antistoff selekteres. Foretrukket har
 20 antistoffet én eller flere av ovennevnte ytterligere egenskapene.

Detaliert beskrivelse

Betegnelsen "antistoff" omfatter de forskjellige formene av antistoffer inkludert hele
 25 antistoffer, antistoff-fragmenter, humane antistoffer, humaniserte antistoffer og genetisk konstruerte antistoffer så lenge de karakteristiske egenskapene i henhold til beskrivelsen er beholdt.

"Antistoff-fragmenter" omfatter en andel av et fullengde antistoff, generelt i det minste den
 30 antigenbindende delen eller den variable regionen derav. Eksempler på antistoff-fragmenter omfatter dimerer, enkeltkjede antistoffmolekyler, immuntoksiner og multispesifikke antistoffer dannet fra antistoff-fragmenter. I tillegg omfatter antistoff-fragmenter enkeltkjede-polypeptider som har egenskapene til en VH-kjede, dvs. er i stand til å settes sammen med en VL-kjede eller til en VL-kjede som binder til IGF-1R, dvs. i

stand til settes sammen med en VH-kjede til en funksjonell antigenbindende grop og derved tilveiebringe egenskapen til å inhibere bindingen av IGF-I og IGF-II til IGF-IR.

"Antistofffragmenter" omfatter også slike fragmenter som i seg selv ikke er i stand til å tilveiebringe effektor-funksjoner (ADCC/CDC) men tilveiebringer denne funksjonen på en måte i henhold til beskrivelsen etter at de er kombinert med passende antistoff konstant(e) domene(r).

Betegnelsene "monoklonalt antistoff" eller "monoklonal antistoff-blanding" som anvendt heri refererer til en fremstilling av antistoffmolekyler av en enkelt aminosyre-sammensetning. Følgelig angir betegnelsen "humant monoklonalt antistoff" antistoffer som oppviser en enkelt bindingsspesifisitet som har variabel og konstant region avledet fra human kjønnselle immunglobulin-sekvenser. I én utførelsesform er de humane monoklonale antistoffene produsert av et hybridom som omfatter en B-celle oppnådd fra et transgent ikke-humant dyr, f.eks. en transgen mus, som har et genom omfattende et humant tung kjede transgen og et lett human kjede transgen fusjonert til en immortalisert celle.

Betegnelsen "kimært antistoff" angir et monoklonalt antistoff omfattende en variabel region, dvs. bindende region, fra én kilde eller art og minst en del av en konstant region avledet fra en ulik kilde eller art, vanligvis fremstilt ved rekombinant DNA-teknikker. Kimære antistoffer omfattende en murin variabel region og en human konstant region er spesielt foretrukket. Slik murine/humane kimære antistoffer er produktet av uttrykte immunglobuliner omfattende DNA-segmenter som koder for murine immunglobulin variable regioner og DNA-segmenter som koder for humane immunglobulin konstante regioner. Andre former for "kimære antistoffer" omfattet av foreliggende beskrivelse er de hvor klassen eller underklassen er modifisert eller endret fra den for det opprinnelige antistoffet. Slik "kimære" antistoffer refereres også til som "antistoffer som har gjennomgått klasseswitch". Fremgangsmåter for fremstilling av kimære antistoffer omfatter konvensjonelle rekombinant DNA og gentransfeksjonsteknikker som nå er velkjente på området. Se, f.eks. Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; US-patenter nr. 5,202,238 og 5,204,244.

Betegnelsen "humanisert antistoff" angir antistoffer hvor struktur ("framework") eller "komplementaritetsbestemmende regioner" (CDR) er modifisert slik at de omfatter CDRen

fra et immunglobulin av ulik spesifisitet sammenlignet med den fra opphavs-
 immunglobulinet. I en foretrukket utførelsesform er en murin CDR bundet til struktur
 ("framework")-regionen fra et humant antistoff for å fremstille det "humaniserte
 antistoffet". Se, f.eks. Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327; og Neuberger,
 5 M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270. Spesielt foretrukne CDR'er svarer til de som
 representerer sekvenser som gjenkjenner antigenene angitt ovenfor for kimære og
 bifunksjonelle antistoffer.

Betegnelsen "humant antistoff", som anvendt heri, skal omfatte antistoffer som har variable
 10 og konstante regioner avledet fra human kjønnselle immunglobulin-sekvenser. Den
 variable tunge kjeden er fortrinnsvis avledet fra kjønnselle-sekvens DP-50 (GenBank
 LO6618) og den variable lette kjeden er foretrukket avledet fra kjønnselle-sekvens L6
 (GenBank X01668). De konstante regionene av antistoffet er konstante regioner av human
 IgG1-type. Slik regioner kan være allotypiske og er beskrevet av, f.eks. Johnson, G. og
 15 Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218 og databasereferansene deri og er
 anvendelige så lenge egenskapene til induksjon av ADCC og foretrukket CDC ifølge
 beskrivelsen bibeholdes.

Betegnelsen "rekombinant humant antistoff", som anvendt heri, skal omfatte alle humane
 20 antistoffer som fremstilles, uttrykkes, dannes eller isoleres ved rekombinante metoder, slik
 som antistoffer isolert fra en vertscelle slik som en SP2-0, NS0 eller CHO-celle eller fra et
 dyr (f.eks. en mus) som er transgent for humane immunglobulingener eller antistoffer
 uttrykt ved anvendelse av en rekombinant ekspresjonsvektor transfektert inn i en vertscelle.
 Slike rekombinante humane antistoffer har variable og konstante regioner avledet fra
 25 human kjønnselle immunglobulin-sekvenser i en rearrangert form. De rekombinante
 humane antistoffene ifølge foreliggende beskrivelse har blitt underlagt in vivo somatisk
 hypermutasjon. Følgelig er aminosyresekvensene av VH og VL-regionene av de
 rekombinante antistoffene sekvenser som, selv om de er avledet fra og relatert til human
 kjønnselle VH og VL-sekvenser, ikke naturlig kan eksistere inne i det humane antistoff
 30 kjønnselle-repertoiret in vivo.

Som anvendt her, angir "binding" antistoffbinding til IGF-IR med en affinitet på ca. 10^{-13}
 til 10^{-8} M (K_D), fortrinnsvis på ca. 10^{-13} til 10^{-9} M.

Betegnelsen "nukleinsyremolekyl", som anvendt heri, skal omfatte DNA-molekyler og RNA-molekyler. Et nukleinsyremolekyl kan være enkeltrådet eller dobbeltrådet, men er foretrukket dobbeltrådet DNA.

- 5 De "konstante domenene" er ikke involvert direkte i binding av antistoffet til et antigen men er involvert i effektor-funksjonene (ADCC, komplementbinding og CDC). Det konstante domenet av et antistoff ifølge foreliggende beskrivelse er av IgG1-typen. Humane konstante domener som har disse karakteristika er beskrevet i detalj av Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) og av Brüggemann, M., et al., J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361; Love, T.W., et al., Methods Enzymol. 178 (1989) 515-527. Eksempler er vist i SEKV ID NR:5 til 8. Andre anvendelige og foretrukne konstante domener er de konstante domenene av antistoffene som kan oppnås fra hybridom-cellelinjene deponert ved DSMZ for foreliggende beskrivelse. De konstante domenene anvendelige i beskrivelsen tilveiebringer komplementbinding. ADCC og eventuelt CDC tilveiebringes ved kombinasjonen av variable og konstante domener.

Den "variable regionen" (variabel region av en lett kjede (VL), variabel region av en tung kjede (VH)) som anvendt heri angir hver av paret av lette og tunge kjeder som er involvert direkte i binding av antistoffet til antigenet. Domenene av variable humane lette og tunge kjeder har samme generelle struktur og hvert domene omfatter fire struktur ("framework") (FR)-regioner hvis sekvenser i stor grad er konservert, forbundet av tre "hypervariable regioner" (eller komplementaritetsbestemmende regioner, CDR'er). Struktur ("framework")-regionene inntar en β -sheet-konformasjon og CDRer kan danne løkker som forbinder β -sheet-strukturen. CDR'ene i hver kjede holdes i sine tredimensjonale strukturer av struktur ("framework")-regioner og danner sammen med CDR'ene fra den andre kjeden det antigenbindende setet. Antistoffets tung og lett kjede CDR3-regioner har en spesielt viktig funksjon i bindingspesifisiteten/affiniteten av antistoffene ifølge foreliggende beskrivelse og tilveiebringer derfor en ytterligere hensikt ifølge beskrivelsen.

30

Betegnelsene "hypervariable region" eller "antigenbindende del av et antistoff" når anvendt heri refererer til aminosyrerestene av et antistoff som er ansvarlig for antigenbinding. Den hypervariable regionen omfatter aminosyrerester fra de "komplementaritetsbestemmende regionene" eller "CDR'er". "Struktur" ("framework") eller "FR"-regioner er de variabel

domene-regionene andre enn de hypervariable region-restene som definert heri. Derfor omfatter de lette og tunge kjedene av et antistoff fra N- til C-terminus domenene FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 og FR4. Spesielt er CDR3 fra den tunge kjeden den regionen som bidrar mest til antigenbinding. CDR og FR-regionene bestemmes i henhold
 5 til standard-definisjonen ifølge Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) og/eller disse restene fra en "hypervariabel løkke".

Betegnelsen "binding til IGF-IR" som anvendt heri betyr bindingen av antistoffet til IGF-
 10 IR i en in vitro-analyse, fortrinnsvis i en bindingsanalyse hvor antistoffet er bundet til en overflate og binding av IGF-IR måles ved Surface Plasmon Resonance (SPR). Binding betyr en bindingsaffinitet (K_D) på 10^{-8} M eller mindre, fortrinnsvis 10^{-13} til 10^{-9} M.

Binding til IGF-IR kan undersøkes ved en BIAcore-analyse (Pharmacia Biosensor AB,
 15 Uppsala, Sverige). Affiniteten av bindingen er definert ved betegnelsene ka (hastighetskonstanten for assosiering av antistoffet fra antistoffet/antigenkomplekset), kd (dissosiasjonskonstant) og K_D (kd/ka). Antistoffene ifølge beskrivelsen oppviser en K_D på 10^{-10} M eller mindre.

20 Bindingen av IGF-I og IGF-II til IGF-IR inhiberes også av antistoffene ifølge beskrivelsen. Inhiberingen måles som IC_{50} i en analyse for binding av IGF-I/IGF-II til IGF-IR på tumorceller. En slik analyse er beskrevet i Eksempel 7. I en slik analyse blir mengden av radioaktivt merket IGF-I eller IGF-II eller IGF-IR-bindende fragmenter derav bundet til IGF-IR tilveiebrakt på overflaten av nevnte tumorceller (f.eks. HT29), målt uten og med
 25 økende konsentrasjoner av antistoffet. IC_{50} -verdiene for antistoffene ifølge foreliggende beskrivelse for bindingen av IGF-I og IGF-II til IGF-IR er ikke mer enn 2 nM og ratioen av IC_{50} -verdiene for binding av IGF-I/IGF-II til IGF-IR er ca. 1:3 til 3:1. IC_{50} -verdier måles som gjennomsnitt eller medianverdier av minst tre uavhengige målinger. Enkelte IC_{50} -verdier kan være utenfor området.

30

Betegnelsen "inhibere bindingen av IGF-I og IGF-II til IGF-IR" som anvendt heri refererer til å inhibere bindingen av I^{125} -merket IGF-I eller IGF-II til IGF-IR presentert på overflaten av HT29 (ATCC HTB-38)-tumorceller i en in vitro-analyse. Inhiberende betyr en IC_{50} -verdi på 2 nM eller lavere.

Betegnelsen "IGF-IR-uttrykkende celler" angir slike celler som overuttrykker IGF-I-reseptor til omtrent minst 20,000 reseptorer/celle. Slike celler er for eksempel tumorcellelinjer slik som NCI H322M eller HT29 eller en cellelinje (f.eks. 3T3 ATCC CRL1658) som overuttrykker IGF-IR etter transfeksjon med en ekspresjonsvektor for IGF-IR. Mengden av reseptorer pr. celle måles i henhold til Lammers et al EMBO J, 8 (1989) 1369-1375

Betegnelsen "hemming av IGF-IR-fosforylering" refererer til en cellulær fosforyleringsanalyse ved anvendelse av 3T3-celler under forutsetning av 400,000 til 600,000 molekyler IGF-IR pr. celle i et medium inneholdende 0,5% varmeinaktivert føtalt kalveserum (FCS) sammenlignet med en slik analyse uten nevnte antistoff. Fosforylering detekteres ved Western blotting ved anvendelse av et antistoff spesifikt for tyrosinfosforylerte proteiner. En slik analyse er beskrevet i Eksempel 11. Varmeinaktivering av FCS utføres ved korttids oppvarming til 56°C for inaktivering av komplementsystemet.

Betegnelsen "hemming av PKB-fosforylering" refererer til en cellulær fosforyleringsanalyse ved anvendelse av 3T3-celler under forutsetning av 400,000 til 600,000 molekyler IGF-IR pr. celle i et medium inneholdende 0,5% varmeinaktivert føtalt kalveserum (FCS) sammenlignet med en slik analyse uten nevnte antistoff. Fosforylering detekteres ved Western blotting ved anvendelse av et antistoff spesifikt for PKB fosforylert ved serin 473 i PKkB (Akt 1, Swiss Prot Acc. nr. P31749). En slik analyse er beskrevet i Eksempel 11.

Betegnelsen "antistoff-avhengig cellulær cytotoxicitet (ADCC)" refererer til lysing av humane tumor-målceller ved et antistoff ifølge foreliggende beskrivelse i nærvær av effektorceller. ADCC måles foretrukket ved behandling av en fremstilling av IGF-IR-uttrykkende celler med et antistoff ifølge beskrivelsen i nærvær av effektorceller slik som ferske isolerte PBMC eller rensede effektorceller fra buffy coats, som monocytter eller NK-celler. ADCC er funnet hvis antistoffet induserer, ved en konsentrasjon på 100 nM, lysing (celledød) av 20% eller mer av tumorcellene etter 24 timer. Dersom ADCC er funnet å være mer uttalt ved 4 timer enn ved 24 timer, utføres målinger ved 4 timer. Analysen utføres foretrukket med ⁵¹Cr eller Eu-merkede tumorceller og måling av spesifikt

frigjort ^{51}Cr eller Eu. Kontroller omfatter inkubering av tumor-måcellene med effektorceller men uten antistoffet.

Betegnelsen "komplementavhengig cytotoksisitet (CDC)" refererer til lysing av humane tumor-måceller ved antistoffet ifølge foreliggende beskrivelse i nærvær av komplement. CDC måles foretrukket ved behandling av en fremstilling av IGF-IR-uttrykkende celler med et antistoff ifølge beskrivelsen i nærvær av komplement. CDC er funnet hvis antistoffet induserer, ved en konsentrasjon på 100 nM, lysing (celledød) av 20% eller mer av tumorcellene etter 4 timer. Analysen utføres foretrukket med ^{51}Cr eller Eu-merkede tumorceller og måling av frigjort ^{51}Cr eller Eu. Kontroller omfatter inkubering av tumor-måcellene med komplement men uten antistoffet.

Betegnelsen "fullstendig hemming av IGF-I-mediert signaltransduksjon" angir hemming av IGF-I-mediert fosforylering av IGF-IR. For en slik analyse stimuleres IGF-IR-uttrykkende celler, fortrinnsvis H322M-celler, med IGF-I og behandles med et antistoff ifølge foreliggende beskrivelse (en antistoffkonsentrasjon på 5 nM eller høyere er anvendelig). Deretter utføres en SDS PAGE og fosforylering av IGF-IR måles ved Western blotting-analyse med et antistoff spesifikt for fosforylert tyrosin. Fullstendig hemming av signaltransduksjonen finnes hvis det ved Western blot ikke åpenlyst kan detekteres noe band som angir fosforylert IGF-IR.

Antistoffene ifølge foreliggende beskrivelse oppviser en binding til den samme epitopen av IGF-IR som antistoff 18 eller er hemmet med hensyn til binding til IGF-IR på grunn av sterisk hindring av binding ved antistoff 18. Hemming av binding kan detekteres ved en SPR-analyse ved anvendelse av immobilisert antistoff 18 og IGF-IR i en konsentrasjon på 20-50 nM og antistoffet som skal detekteres i en konsentrasjon på 100 nM. En signalreduksjon på 50% eller mer viser at antistoffet konkurrerer med antistoff 18. En slik analyse kan utføres på samme måte ved anvendelse av antistoff 22 som et immobilisert antistoff.

30

Betegnelsen "epitop" betyr en proteindeterminant som er i stand til å binde spesifikt til et antistoff. Epitoper består vanligvis av kjemisk aktive overflategrupper av molekyler slik som aminosyrer eller sukker-sidekjeder og har vanligvis spesifikke tredimensjonale strukturelle karakteristika, så vel som spesifikke ladningsegenskaper. Konformasjonelle og

ikke-konformasjonelle epitoper kjennetegnes ved at bindingen til førstnevnte men ikke til sistnevnte går tapt i nærvær av denaturerende løsningsmidler.

- Antistoffene ifølge foreliggende beskrivelse omfatter, i tillegg, slike antistoffer som har
- 5 "konservative sekvensmodifikasjoner", nukleotid- og aminosyresekvensmodifikasjoner som ikke påvirker eller endrer ovennevnte karakteristika for antistoffet ifølge beskrivelsen. Modifikasjoner kan innføres ved standard teknikker kjent på området, slik som seterettet mutagenese og PCR-mediert mutagenese. Konservative aminosyresubstitusjoner omfatter slike hvor aminosyreresten erstattes med en aminosyrerest som har en lignende sidekjede.
- 10 Familier av aminosyrerester som har lignende sidekjeder er definert på området. Disse familiene omfatter aminosyrer med basiske sidekjeder (f.eks. lysin, arginin, histidin), sure sidekjeder (f.eks. asparaginsyre, glutaminsyre), uladete polare sidekjeder (f.eks. glysin, asparagin, glutamin, serin, treonin, tyrosin, cystein, tryptofan), ikke-polare sidekjeder (f.eks. alanin, valin, leucin, isoleucin, prolin, fenylalanin, metionin), beta-forgrenede
- 15 sidekjeder (f.eks. treonin, valin, isoleucin) og aromatiske sidekjeder (f.eks. tyrosin, fenylalanin, tryptofan, histidin). Følgelig kan en predikert ikke-essensiell aminosyrerest i et humant anti-IGF-IR antistoff foretrukket erstattes med en annen aminosyrerest fra samme familie av sidekjeder.
- 20 Aminosyresubstitusjoner kan utføres ved mutagenese basert på molekylær modellering som beskrevet av Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327 og Queen, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989)10029-10033.

- I en foretrukket utførelsesform ifølge foreliggende beskrivelse karakteriseres antistoffene
- 25 ifølge beskrivelsen ytterligere ved én eller flere av trekkene valgt fra gruppen valgt fra bindingsparametrene k_a , k_d og K_D , binding til den samme epitopen som antistoffene 18 og 22 binder til, IC_{50} -verdiene for hemming av binding av IGF-I og IGF-II til IGF-IR på tumorceller og IC_{50} -verdiene for hemming av fosforylering av IGF-IR etter stimulering av IGF-I i tumorceller. Hemming av fosforylering av IGF-IR fører til hemming av
- 30 fosforylering av elementer nedstrøms slik som PKB, nedregulering av IGF-IR i tumorceller og påvirkning av den tredimensjonale veksten av tumorceller in vitro. Antistoffene karakteriseres ytterligere foretrukket ved deres farmakokinetiske og farmakodynamiske verdier og kryss-reaktiviteten for andre arter.

Antistoffene ifølge beskrivelsen hemmer IGF-IR-fosforylering av tyrosin og foretrukket også PKB-fosforylering av tyrosin i lik grad.

5 Antistoffene ifølge beskrivelsen nedregulerer foretrukket IGF-IR protein-nivået i tumorceller og i tumorer, f.eks. xenograft tumorer.

10 Antistoffene ifølge foreliggende beskrivelse hemmer foretrukket den tredimensjonale veksten av tumorceller i en analyse av kolonidannelse, så vel som proliferasjon av IGF-IR-uttrykkende celler (f.eks. NIH 3T3-celler).

Antistoffene ifølge foreliggende beskrivelse hemmer foretrukket ikke binding av insulin til insulinreseptor i en bindings konkurranse-analyse på insulinreseptor-overuttrykkene 3T3-celler ved anvendelse av antistoffet i en konsentrasjon på 200 nmol/l.

15 Antistoffene ifølge foreliggende beskrivelse fremstilles foretrukket ved rekombinante metoder. Slike metoder er tidligere kjent i stor utstrekning på området og omfatter proteinekspresjon i prokaryote og eukaryote celler med påfølgende isolering av antistoffpolypeptidet og vanligvis rensning til en farmasøytisk akseptabel renhet. For proteinekspresjonen, insereres nukleinsyrer som koder for lette og tunge kjeder eller
20 fragmenter derav i ekspresjonsvektorer ved standardmetoder. Ekspresjon utføres i egnede prokaryote eller eukaryote vertsceller som CHO-celler, NS0-celler, SP2/0-celler, HEK293-celler, COS-celler, gjær eller E.coli-celler og antistoffet utvinnes fra cellene (supernatant eller celler etter lysing).

25 Rekombinant fremstilling av antistoffer er velkjent på området og beskrevet, for eksempel i oversiktsartiklene ifølge 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.

30 Antistoffene kan være til stede i hele celler, i et cellelysat eller i en delvis rensset eller hovedsakelig ren form. Rensning utføres for å eliminere andre cellulære komponenter eller andre forurensninger, f.eks. andre cellulære nukleinsyrer eller proteiner, ved standardteknikker, omfattende alkalisk/SDS-behandling, CsCl-”banding”, kolonnekromatografi, agarose gel-elektroforese og andre velkjente på området. Se

Ausubel, F., et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987).

5 Ekspresjon i NS0-celler er beskrevet av, f.eks. Barnes, L.M., et al., *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123; og Barnes, L.M., et al., *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270. Transient ekspresjon er beskrevet av, f.eks. Durocher, Y., et al., *Nucl. Acids Res.* 30 (2002) E9. Kloning av variable domener er beskrevet av 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; og Norderhaug, L., et al., *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87. Et foretrukket transient 10 ekspresjonssystem (HEK 293) er beskrevet av Schlaeger, E.-J. og Christensen, K., i *Cytotechnology* 30 (1999) 71-83 og av Schlaeger, E.-J., i *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199.

15 Kontrollsekvenser som er egnet for prokaryote celler omfatter, for eksempel, en promoter, eventuelt en operatorsekvens og et ribosombindingssete. Eukaryote celler er kjent å anvende promotere, enhancere og polyadenyleringssignaler.

20 Nukleinsyre er "operabelt bundet" når den er anbrakt i en funksjonell forbindelse med en annen nukleinsyresekvens. For eksempel er DNA for en presekvens eller sekretorisk leder operabelt bundet til DNA for et polypeptid hvis det uttrykkes som et preprotein som tar del i sekresjonen av polypeptidet; en promoter eller enhancer er operabelt bundet til en kodende sekvens hvis den påvirker transkripsjonen av sekvensen; eller et ribosombindingssete er operabelt bundet til en kodende sekvens hvis det er posisjonert slik at det letter translasjon. Generelt betyr "operabelt bundet" at DNA-sekvensene som er forbundet 25 er påfølgende og, i tilfellet av en sekretorisk leder, påfølgende og i leseramme. Enhancere behøver imidlertid ikke å være påfølgende. Binding fullføres ved ligering ved passende restriksjonsseter. Hvis slike seter ikke eksisterer, anvendes syntetiske oligonukleotid-adaptore eller linkere i henhold til konvensjonell praksis.

30 De monoklonale antistoffene separeres hensiktsmessig fra dyrkningsmediet ved konvensjonelle immunglobulin rensningsmetoder slik som for eksempel protein A-Sepharose, hydroksylapatitt-kromatografi, gel-elektroforese, dialyse eller affinitetskromatografi. DNA og RNA som koder for de monoklonale antistoffene isoleres og sekvenseres enkelt ved anvendelse av konvensjonelle metoder. Hybridom-cellene kan

tjene som en kilde for slikt DNA og RNA. Når det først er isolert, kan DNA inserteres i ekspresjonsvektorer, som deretter transfekteres inn i vertsceller slik som HEK 293-celler, CHO-celler eller myelomceller som ellers ikke på produserer immunglobulinprotein, for å oppnå syntese av rekombinante monoklonale antistoffer i vertscellene.

5

Aminosyresekvensvarianter av humant IGF-IR-antistoff fremstilles ved å innføre passende nukleotidendringer inn i antistoff-DNA'et eller ved peptidsyntese. Slike modifikasjoner kan imidlertid utføres kun i et svært begrenset område, f.eks. som beskrevet ovenfor. For eksempel endrer ikke modifikasjonene de ovennevnte antistoff-karakteristika slik som IgG-isotypen og epitop-binding, men kan forbedre utbyttet av den rekombinante produksjonen, proteinstabiliteten eller lette rensingen.

10

Hvilken som helst cysteinrest som ikke er involvert i å opprettholde riktig konformasjon av anti-IGF-IR-antistoffet kan også substitueres, generelt med serin, for å forbedre den oksydative stabiliteten av molekylet og forhindre abnorm kryssbinding. Omvendt kan cysteinbinding(er) tilføyes til antistoffet for å forbedre dets stabilitet (spesielt hvor antistoffet er et antistoffragment slik som et Fv-fragment).

15

En annen type aminosyrevariant av antistoffet endrer antistoffets opprinnelige glykosyleringsmønster. Med endring menes å deletere én eller flere karbohydratgrupper funnet i antistoffet og/eller tilføye ett eller flere glykosyleringssteder som ikke er til stede i antistoffet. Glykosylering av antistoffer er typisk N-bundet. N-bundet refererer til bindingen av karbohydratgruppen til sidekjeden av en asparaginrest. Tripeptidsekvensene asparagin-X-serin og asparagin-X-treonin, hvor X er hvilken som helst aminosyre bortsett fra prolin, er gjenkjennelsessekvensene for enzymatisk binding av karbohydratgruppen til asparagin-sidekjeden. Følgelig skaper tilstedeværelsen av hvilket som helst av disse tripeptidsekvensene i et polypeptid et potensielt glykosyleringssete. Tilføyelser av glykosyleringssteder til antistoffet oppnås hensiktsmessig ved å endre aminosyresekvensen slik at det inneholder én eller flere av de ovenfor beskrevne tripeptidsekvensene (for N-bundne glykosyleringssteder).

25

30

Nukleinsyremolekyler som koder for aminosyresekvensvarianter av anti-IGF-IR-antistoff fremstilles ved en rekke metoder kjent på området. Disse metodene isolering fra en naturlig kilde (i tilfellet av naturlig forekommende aminosyresekvensvarianter) eller fremstilling

ved oligonukleotid-mediert (eller seterettet) mutagenese, PCR-mutagenese og kassett-mutagenese av en tidligere fremstilt variant eller en ikke-variant utgave av humanisert anti-IGF-IR-antistoff.

- 5 Beskrivelsen angår også immunokonjugater omfattende antistoffet ifølge foreliggende beskrivelsen konjugert til et cytotoxisk middel slik som et kjemoterapeutisk middel, toksin (f.eks. et enzymatisk aktivt toksin av bakteriell, sopp, plante eller animalsk opprinnelse eller fragmenter derav), en radioaktiv isotop (dvs. et radiokonjugat) eller et prodrug av et cytotoxisk middel. Midler anvendelige i dannelsen av slike
- 10 immunokonjugater er beskrevet ovenfor. Enzymatisk aktive toksiner og fragmenter derav som kan anvendes omfatter difteri A-kjede, ikke-bindende aktive fragmenter av difteritoksin, eksotoksin A-kjede (fra *Pseudomonas aeruginosa*), ricin A-kjede, abrin A-kjede, modeccin A-kjede, alpha-sarcin, Aleuritesfordii-proteiner, dianthin-proteiner, *Phytolaca americana*-proteiner (PAPI, PAPII og PAP-S), momordica charantia-inhibitor,
- 15 curcin, crotin, sapaonaria officinalis-inhibitor, gelonin, mitogellin, restrictocin, fenomycin, enomycin og trikotecenene.

Konjugater av antistoffet og cytotoxisk middel er fremstilt ved anvendelse av en rekke bifunksjonelle protein-koblingsmidler slik som N-succinimidyl-3-(2-

20 pyridylditiol)propionat (SPDP), iminotiolan (DET), bifunksjonelle derivater av imidoestere; (slik som dimetyladipimidat-HCL), aktive estere (slik som disuccinimidylsuberat), aldehyder (slik som glutaraldehyd), bis-azido-forbindelser (slik som bis (p-azidobenzoyl)heksandiamin), bis-diazonium-derivater (slik som bis-(p-diazoniumbenzoyl)-etylendiatnin), diisocyanater (slik som tolyen-2,6-diisocyanat) og bis-

25 aktive fluorforbindelser (slik som 1,5-difluor-2,4-dinitrobenzen). For eksempel kan et ricin-immuntoksin fremstilles som beskrevet i Vitetta, E.S., et al., Science 238 (1987) 1098-1104). Karbon-14-merket 1-isotiocyanatobenzyl-3-metyldietylen-triaminpentaeddiksyre (MX-DTPA) er et eksempel på et chelaterende middel for konjugering av radionukleotid til antistoffet. Se WO 94/11026.

30

En annen type kovalent modifikasjon omfatter kjemisk eller enzymatisk binding av glykosider til antistoffet. Disse metodene er fordelaktige i at de ikke krever produksjon av antistoffet i en vertscelle som har glykosylerings-evne med hensyn til N- eller O-bundet glykosylering. Avhengig av koblingsmetoden anvendt, kan sukkeret være bundet til (a)

arginin og histidin, (b) frie karboksylgrupper, (c) frie sulfhydrylgrupper slik som de fra cystein, (d) frie hydroksylgrupper slik som de fra serin, treonin eller hydroksyprolin, (e) aromatiske rester slik som de fra fenylalanin, tyrosin eller tryptofan eller (f) amidgruppen fra glutamin. Disse metodene er beskrevet i WO 87/05330 og i Aplin, J.D. og Wriston, J.C.
5 Jr., CRC Crit. Rev. Biochem. (1981) 259-306.

Fjerning av hvilke som helst karbohydratgrupper til stede på antistoffet kan gjennomføres kjemisk eller enzymatisk. Kjemisk deglykosylering krever eksponering av antistoffet for forbindelsen trifluormetansulfonsyre eller en ekvivalent forbindelse. Denne behandlingen
10 fører til kløyving av det meste eller alt sukkeret bortsett fra det forbindende sukkeret (N-acetylglukosamin eller N-acetylgalaktosamin), mens det etterlater antistoffet intakt. Kjemisk deglykosylering er beskrevet av Sojahr, H.T. og Bahl, O.P., Arch. Biochem. Biophys. 259 (1987) 52-57 og av Edge, A.S., et al. Anal. Biochem. 118 (1981) 131-137. Enzymatisk kløyving av karbohydratgrupper på antistoffer kan oppnås ved anvendelse av
15 en rekke endo- og ekso-glykosidaser som beskrevet av Thotakura, N.R. og Bahl, O.P., Meth. Enzymol. 138 (1987) 350-359.

En annen type kovalent modifikasjon av antistoffet omfatter binding av antistoffet til én av en rekke ikke-proteinholdige polymerer, f.eks., polyetylenglykol, polypropylenglykol eller
20 polyoksyalkylener, på den måten som er vist i US-patenter nr. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 eller 4,179,337.

Ved enda et annet aspekt tilveiebringer beskrivelsen isolerte B-celler fra et transgent ikke-humant dyr, f.eks. en transgen mus, som uttrykker de humane anti IGF-IR-antistoffene
25 ifølge beskrivelsen. Foretrukket oppnås de isolerte B-cellene fra et transgent ikke-humant dyr, f.eks. en transgen mus, som er immunisert med en rensset eller anrikt fremstilling av IGF-IR-antigen og/eller celler som uttrykker IGF-IR. Foretrukket har det transgene ikke-humane dyret, f.eks. en transgen mus, et genom omfattende et humant tung kjede transgen og et humant lett kjede transgen som koder for hele eller en del av et antistoff ifølge
30 foreliggende beskrivelse. De isolerte B-cellene blir deretter immortalisert for å tilveiebringe en kilde (f.eks. et hybridom) av humane anti-IGF-IR-antistoffer. Følgelig tilveiebringer foreliggende beskrivelse også et hybridom som er i stand til å produsere humane monoklonale antistoffer ifølge foreliggende beskrivelse. I én utførelsesform omfatter hybridomet en B-celle oppnådd fra et transgent ikke-humant dyr, f.eks. en

transgen mus som har et genom omfattende et humant tung kjede transgen og et humant lett kjede transgen som koder for hele eller en del av et antistoff ifølge foreliggende beskrivelse, fusjonert til en immortalisert celle.

- 5 I en bestemt utførelsesform er det transgene ikke-humane dyret en transgen mus som har et genom som omfatter et humant tung kjede transgen og et humant lett kjede transgen som koder for hele eller en del av et antistoff ifølge foreliggende beskrivelse. Det transgene ikke-humane dyret kan være immunisert med et rensset eller anrikt fremstilling av IGF-IR-antigen og/eller celler som uttrykker IGF-IR. Foretrukket er det transgene ikke-humane dyret, f.eks. den transgene musen, i stand til å produsere IgG1-isotyper av humane monoklonale antistoffer mot IGF-IR.

- 15 De humane monoklonale antistoffene ifølge foreliggende beskrivelse kan fremstilles ved å immunisere et transgent ikke-humant dyr, f.eks. en transgen mus, som har et genom som omfatter et humant tung kjede transgen og et humant lett kjede transgen som koder for hele eller en del av et antistoff ifølge beskrivelsen, med en rensset eller anrikt fremstilling av IGF-IR antigen og/eller celler som uttrykker IGF-IR. B-celler (f.eks. milt B-celler) fra dyret blir deretter oppnådd og fusjonert med myelomceller for å danne udødelige hybridomceller som utskiller humane monoklonale antistoffer mot IGF-IR.

- 20 I en foretrukket utførelsesform kan humane monoklonale antistoffer rettet mot IGF-IR fremstilles ved anvendelse av transgene mus som bærer deler av det humane immunsystemet heller enn systemet fra mus. Disse transgene musene, referert til heri som "HuMAb"-mus, inneholder et humant immunoglobulingen minilocus som koder for ikke-rearrangerte humane immunoglobulingener som omfatter tung (μ og γ) og κ lett kjede (konstant region-gener), sammen med målrettede mutasjoner som inaktiverer de endogene μ og κ kjede-loci (Lonberg, N., et al., Nature 368 (1994) 856-859). Følgelig oppviser musene redusert ekspresjon av mus IgM eller K, og som respons på immunisering gjennomgår de innførte humane tung og lett kjede transgenene klasse-switching og somatisk mutasjon for å danne høyaffinitets humane IgG monoklonale antistoffer
- 25 (Lonberg, N., et al., Nature 368 (1994) 856-859; gjennomgått i Lonberg, N., Handbook of Experimental Pharmacology 113 (1994) 49-101; Lonberg, N. og Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. 25 (1995) 65-93; og Harding, F. og Lonberg, N., Ann. N. Acad. Sci 764 (1995) 536-546). Fremstilling av HuMAb-mus er beskrevet i Taylor, L., et al., Nucleic Acids
- 30

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. og Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* 25 (1995) 65-93; Harding, F. og Lonberg, N., *Ann. N. Acad. Sci* 764 (1995) 536-546; Fishwild, D.M., et al., *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 845-851. Se videre US-patenter nr. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 10 5,814,318; 5,874,299; 5,545,807; 5,770,429; WO 98/24884; WO 94/25585; WO 93/1227; WO 92/22645; og WO 92/03918.

For å fremstille fullstendige humane monoklonale antistoffer mot IGF-IR, kan HuMAb-mus immuniseres med en rensset eller anrikt fremstilling av IGF-IR-antigen og/eller celler som uttrykker IGF-IR i henhold til den generelle metoden, som beskrevet av Lonberg, N., 15 et al., *Nature* 368 (1994) 856-859; Fishwild, D.M., et al., *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 845-851 og WO 98/24884. Foretrukket vil musene være 6-16 uker gamle ved den første immuniseringen. For eksempel kan en rensset eller anrikt fremstilling av oppløselig IGF-IR-antigen (f.eks. rensset fra IGF-IR-uttrykkende celler) anvendes for å immunisere 20 HuMAb-musene intraperitonealt. I tilfelle immuniseringer ved anvendelse av en rensset eller anrikt fremstilling av IGF-IR-antigen ikke resulterer i antistoffer, kan mus også immuniseres med celler som uttrykker IGF-IR, f.eks. en tumorcellelinje, for å fremme immunresponser. Samlet erfaring med forskjellige antigener har vist at de HuMAb transgene musene responderer best når de initielt immuniseres intraperitonealt (i.p.) med 25 antigen i complete Freund's adjuvans, etterfulgt av i.p. immuniseringer hver andre uke (for eksempel opptil totalt 6) med antigen i incomplete Freund's adjuvans. Immunresponser kan overvåkes under immuniseringsprotokollen med plasmaprøver oppnådd ved retroorbitale blødninger. Plasmaet kan screenes ved ELISA og mus med tilstrekkelig titere av anti-IGF-IR humant immunglobulin kan anvendes for immortalisering av 30 korresponderende B-celler. Mus kan boostes intravenøst med antigen 3 til 4 dager før avlivning og fjerning av milten og lymfeknutene. Det er forventet at det kan være nødvendig å utføre 2-3 fusjoner for hvert antigen. Mange mus vil immuniseres for hvert antigen. For eksempel kan totalt tolv HuMAb-mus fra HCo7 og HCo12-stammene immuniseres.

HCo7-musene har en JKD-forstyrrelse i sine endogen lett kjede (kappa)-gener (som beskrevet i Chen, J., et al., EMBO J. 12 (1993) 821-830), en CMD- forstyrrelse i sine endogen tung kjede-gener (som beskrevet i Eksempel 1 i WO 01/14424), et KCo5 humant
 5 kappa lett kjede transgen (som beskrevet i Fishwild, D.M., et al., Nat. Biotechnol. 14 (1996) 845-851) og et HCo7 human tung kjede transgen (som beskrevet i US-patent nr. 5,770,429).

HCo12-musene har en JKD-fortyrrelse i sine endogen lett kjede (kappa)-gener (som
 10 beskrevet i Chen, J., et al., EMBO J. 12 (1993) 821-830), en CMD-forstyrrelse i sine endogene tung kjede-gener (som beskrevet i Eksempel 1 i WO 01/14424), et KCo5 human kappa lett kjede transgen (som beskrevet i Fishwild, D.M., et al., Nat. Biotechnol. 14 (1996) 845-851) og et HCo12 human tung kjede transgen (som beskrevet i Eksempel 2 i WO 01/14424).

15

Lymfocytene fra mus kan isoleres og fusjoneres med en mus myelom celledinje ved anvendelse av PEG basert på standardmetoder for å fremstille hybridomer. De resulterende hybridomene screenes deretter for produksjon av antigen-spesifikke antistoffer. For eksempel fusjoneres enkeltcelle-suspensjoner av milt og lymfeknute-avledede lymfocytter
 20 fra immuniserte mus til en sjettedel av antallet SP 2/0 ikke-sekretende mus myelom-celler (ATCC, CRL 1581) med 50% PEG. Celler plates ut ved omtrent 2×10^5 i flatbunnet mikrotiterplate, etterfulgt av omtrent to ukers inkubering i selektivt medium.

Individuelle brønner screenes deretter ved ELISA for humane anti-IGF-IR monoklonale
 25 IgM og IgG-antistoffer. Straks omfattende hybridomvekst oppstår, analyseres mediet, vanligvis etter 10-14 dager. Hybridomene som utkiller antistoff plates ut på nytt, screenes igjen og dersom de fortsatt er positive for human IgG, anti-IGF-IR monoklonale antistoffer, kan de subklones minst to ganger ved begrensede fortytning. De stabile subklonene dyrkes deretter in vitro for å produsere antistoff i vevskulturmedium for
 30 karakterisering.

Fordi CDR-sekvenser er ansvarlige for antistoff-antigen-interaksjoner, er det mulig å uttrykke rekombinante antistoffer ifølge foreliggende beskrivelse ved å konstruere ekspresjonsvektorer som omfatter CDR-sekvensene ifølge beskrivelsen til struktur

(”framework”)-sekvenser fra et ulikt humant antistoff (se f.eks. Riechmann, L., et al., Nature 332 (1998) 323-327; Jones, P., et al., Nature 321 (1986) 522-525; og Queen, C., et al., Proc. Natl. Acad. Se. U.S.A. 86 (1989)10029-10033). Slike struktur (”framework”)-sekvenser kan oppnås fra offentlige DNA-databaser som omfatter humane kjønnselle antistoff-gensekvenser. Disse kjønnselle-sekvensene vil skille seg fra modne antistoff-gensekvenser fordi de ikke vil omfatte fullstendig sammensatte variable gener, som dannes ved V(D)J-sammenføyning under modning av B-celler. Gensekvenser fra kjønnseller vil også skille seg fra sekvensene av et høyaffinitets sekundært repertoir-antistoff individuelt jevnt over den variable regionen.

10

Beskrivelsen omfatter foretrukket et nukleinsyrefragment som koder for et polypeptid som binder til IGF-IR, hvorved nevnte polypeptid hemmer bindingen av IGF-I og IGF-II til IGF-IR, valgt fra gruppen bestående av

15

- a) en antistoff tung kjede omfattende som CDR'er CDR1 (aa 31-35), CDR2 (aa 50-66) og CDR3 (aa 99-107) ifølge SEKV ID NR:1 eller 3;
- b) en antistoff lett kjede omfattende som CDR'er CDR1 (aa 24-34), CDR2 (aa 50-56) og CDR3 (aa 89-98) ifølge SEKV ID NR:2 eller 4.

20

De rekonstruerte tung og lett kjede variable regionene settes sammen med sekvenser for promoter, translasjonsinitiering, konstant region, 3' untranslated, polyadenylering og transkripsjonsterminering for å danne ekspresjonsvektorkonstruksjoner. Tung og lett kjede ekspresjonskonstruksjonene kan settes sammen til en enkelt vektor, ko-transfekteres, transfekteres serielt eller transfekteres hver for seg inn i vertsceller som deretter fusjoneres for å danne en enkelt vertscelle som uttrykker begge kjedene.

25

Foreliggende beskrivelse tilveiebringer følgende en fremgangsmåte for fremstilling av et rekombinant humant antistoff ifølge beskrivelsen, karakterisert ved å uttrykke en nukleinsyre som koder for

30

- a) en antistoff tung kjede omfattende som CDR'er CDR1 (aa 31-35), CDR2 (aa 50-66) og CDR3 (aa 99-107) ifølge SEKV ID NR:1 eller 3;
- b) en antistoff lett kjede omfattende som CDR'er CDR1 (aa 24-34), CDR2 (aa 50-56) og CDR3 (aa 89-98) ifølge SEKV ID NR:2 eller 4.

Beskrivelsen omfatter videre anvendelse av et antistoff ifølge beskrivelsen for diagnose av IGF-IR in vitro, foretrukket ved en immunologisk analyse for bestemmelse av bindingen mellom IGF-IR i en prøve og antistoffet ifølge beskrivelsen.

5

I et annet aspekt tilveiebringer foreliggende beskrivelse en blanding, f.eks. en farmasøytisk blanding, inneholdende ett eller en kombinasjon av humane monoklonale antistoffer eller den antigenbindende delen derav, ifølge foreliggende beskrivelse, formulert sammen med en farmasøytisk akseptabel bærer.

10

Farmasøytiske blandinger ifølge beskrivelse kan også administreres i kombinasjonsterapi, dvs. kombinert med andre midler. For eksempel kan kombinasjonsterapien omfatte en blanding ifølge foreliggende beskrivelse med minst ett antitumormiddel eller annen konvensjonell behandling.

15

Et "kjemoterapeutisk middel" er en kjemisk forbindelse anvendelig ved behandling av kreft. Eksempler på kjemoterapeutiske midler omfatter Adriamycin, Doxorubicin, 5-fluoruracil, cytosin arabinosid ("Ara-C"), cyklofosamid, tiotepa, Taxotere (docetaxel), busulfan, gemcitabin, Cytosin, Taksol, metotreksat, cisplatin, melfalan, vinblastin, Bleomycin, etoposid, ifosfamid, mitomycin C, mitoksantron, vinorelbin, karboplatin, teniposid, daunomycin, carminomycin, aminopterin, daktinomycin, mitomyciner, esperamiciner (se US-patent nr. 4,675,187), melphalan og annen relatert "nitrogensennep".

25

Betegnelsen "cytotoksisk middel" som anvendt heri angir en substans som hemmer eller forhindrer funksjonen av celler og/eller forårsaker destruksjon av celler. Betegnelsen er ment å omfatte radioaktive isotoper, kjemoterapeutiske midler og toksiner slik som enzymatisk aktive toksiner av bakteriell sopp, plante eller animalsk opprinnelse eller fragmenter derav.

30

Betegnelsen "prodrug" som anvendt i denne søknaden refererer til en forløper eller derivat-form av en farmasøytisk aktiv substans som er mindre cytotoxisk for tumorceller sammenlignet med opphavs-medikamentet og kan bli enzymatisk aktivert eller omdannet til den mer aktive opphavs-formen. Se, f.eks. Wilman, "Prodrug in Cancer Chemotherapy"

Biochemical Society Transactions, 14, s. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) og Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), s. 247-267, Humana Press (1985). Prodrugs ifølge foreliggende beskrivelse omfatter fosfat-inneholdende prodrugs, tiofosfat-inneholdende prodrugs, sulfat-inneholdende prodrugs, peptid-inneholdende prodrugs, D-aminosyre-modifiserte prodrugs, glykosylerte prodrugs, β -laktam ring prodrugs, eventuelt substituerte fenoksyacetamid-inneholdende prodrugs eller eventuelt substituerte fenylacetamid-inneholdende prodrugs, 5-fluorcytosin og andre 5-fluoruridin prodrugs som kan omdannes til det mer aktive cytotoxiske frie medikamentet. Eksempler på cytotoxiske medikamenter som kan derivatiseres til en prodrug-form for anvendelse ved foreliggende beskrivelse omfatter de kjemoterapeutiske midlene beskrevet ovenfor.

Som anvendt heri omfatter "farmasøytisk akseptabel bærer" hvilket som helst og alle løsningsmidler, dispersjonsmedia, belegg, antibakterielle og antifungale midler, isotoniske og absorpsjonsforsinkende midler og lignende som er fysiologisk kompatible. Foretrukket er bæreren egnet for intravenøs, intramuskulær, subkutan, parenteral, spinal eller epidermal administrering (f.eks. ved injeksjon eller infusjon).

Et "farmasøytisk akseptabelt salt" angir et salt som bibeholder den ønskede biologiske aktiviteten av antistoffet og ikke meddeler noen uønskede toksikologiske effekter (se f.eks. Berge, S.M., et al., J. Pharm. Sci. 66 (1977) 1-19). Slike salter er omfattet i beskrivelsen. Eksempler på slike salter omfatter syreaddisjonssalter og baseaddisjonssalter. Syreaddisjonssalter omfatter de avledet fra ikke-toksiske uorganiske syrer, slik som saltsyresalter.

En blanding ifølge foreliggende beskrivelse kan administreres ved en rekke metoder kjent på området. Som det vil forstås av fagfolk, vil administrasjonsruten og/eller -metoden variere avhengig av de ønskede resultatene.

For å administrere en forbindelse ifølge beskrivelsen ved bestemte administreringsmetoder, kan det være nødvendig å overtrekke forbindelsen med eller administrere forbindelsen sammen med et materiale for å forhindre dens inaktivering. For eksempel kan forbindelsen administreres til et individ i en passende bærer, for eksempel liposomer eller et

fortynningsmiddel. Farmasøytisk akseptable fortynningsmidler omfatter saltløsning og vandig bufferløsninger.

5 Farmasøytisk akseptable bærere omfatter sterile vandige løsninger eller dispersjoner og sterile pulvere for ekstemperert fremstilling av sterile injiserbare løsninger eller dispersjon. Anvendelse av slike media og midler for farmasøytisk aktive substanser er kjent på området.

10 Frasene "parenteral administrering" og "administrert parenteralt" som anvendt heri betyr administreringsmetoder forskjellig fra enteral og topisk administrering, vanligvis ved injeksjon og omfatter intravenøs, intramuskulær, intraarteriell, intratekal, intrakapsulær, intraorbital, intrakardiell, intradermal, intraperitoneal, transtracheal, subkutan, subcuticular, intraartikulær, subkapsulær, subaraknoidal, intraspinal, epidural og intrasternal injeksjon og infusjon.

15 Disse blandingene kan også inneholde adjuvantia slik som konserveringsmidler, fuktemidler, emulgeringsmidler og dispergeringsmidler. Forhindring av tilstedeværelse av mikroorganismer kan sikres både ved steriliseringsprosedyrer, supra og ved innbefatning av forskjellige antibakterielle og antifungale midler, for eksempel paraben, klorbutanol, 20 fenol, sorbinsyre og lignende. Det kan også være ønskelig å inkludere isotoniske midler, slik som sukker, natriumklorid og lignende i blandingene. I tillegg kan forlenget absorpsjon av den injiserbare farmasøytiske formen bevirkes ved inklusjon av midler som forsinker absorpsjon slik som aluminiummonostearat og gelatin.

25 Uansett administrasjonsrute som velges, formuleres forbindelsene ifølge foreliggende beskrivelse, som kan anvendes i en egnet hydratisert form og/eller de farmasøytiske blandingene ifølge foreliggende beskrivelse, til farmasøytisk akseptable doseringsformer ved konvensjonelle metoder kjent for fagfolk på området.

30 Aktuelle dosenivåer av de aktive bestanddelene i de farmasøytiske blandingene ifølge foreliggende beskrivelse kan varieres for å oppnå en mengde av den aktive bestanddelen som er effektiv for å oppnå den ønskede terapeutiske responsen for en bestemt pasient, blanding og administreringsmetode, uten å være toksisk for pasienten. De valgte dosenivåene vil avhenge av en rekke farmakokinetiske faktorer omfattende aktiviteten av

de bestemte blandingene ifølge foreliggende beskrivelse som anvendes, administrasjonsruten, tid for administrering, utskillingshastigheten for den bestemte forbindelsen som anvendes, varigheten av behandlingen, andre medikamenter, forbindelser og/eller materialer anvendt i kombinasjon med de bestemte blandingene som anvendes, 5 alder, kjønn, vekt, tilstand, generell helse og tidligere medisinsk historie for pasienten som behandles og lignede faktorer velkjent innen medisin.

Blandingen må være steril og flytende i den grad at blandingen kan leveres med sprøyte. I tillegg til vann, kan bæreren være en isotonisk bufret saltoppløsning.

10

Riktig fluiditet kan opprettholdes, for eksempel, ved anvendelse av belegg slik som lecitin, ved opprettholdelse av nødvendig partikkelstørrelse i tilfellet av dispersjon og ved anvendelse av surfaktanter. I mange tilfeller er det foretrukket å inkludere isotone midler, for eksempel sukker, polyalkoholer slik som mannitol eller sorbitol og natriumklorid i 15 blandingen.

De følgende eksemplene, referansene, sekvenslistene og figurene er gitt for å bidra til forståelsen av foreliggende oppfinnelse, for hvilken det sanne omfanget er vist i de tilhørende patentkravene.

20

Beskrivelse av sekvensenlisten

SEKV ID NR: 1-4 Nukleotid og amino-sekvenser av lett og tung variabel region-domener av antistoffene 18 og 22

SEKV ID NR: 5 og 6 Nukleotid og amino-sekvenser av human konstant region-domene

25 **Beskrivelse av figurene**

Figur 1 IGF-IR overflateekspresjon i cellekultur med lav og høy tetthet.

Figur 2 WST-analyse (NCI H322M-celler) for hemming av proliferasjon i 3D-kultur.

- Figur 3** Kolonidannelse-analyse for hemming av proliferasjon i 3D-kultur (mikroskopi bilde).
- Figur 4** Kolonidannelse-analyse for hemming av proliferasjon i 3D-kultur (kvantifisering). ktr = kontroll; Cl 18 = antistoff 18.
- 5 **Figur 5** Hemning av I¹²⁵-IGF-I-binding til HT29-celler ved antistoffene 18 og 22 (IC₅₀-verdier).
- Figur 6** Hemning av I¹²⁵-IGF-II-binding til HT29-celler ved antistoff 18.
- Figur 7** Hemning av I¹²⁵-IGF-II-binding til HT29-celler ved antistoff αIR3.
- Figur 8** Blokkering av IGF-I-indusert fosforylering av både IGF-IR og Akt/PkB.
10
- Figur 9** Ingen hemning av I¹²⁵-insulinbinding til 3T3-IR-celler ved anti-hlGF-1R-antistoffer. (MAKS w/o Ab: maksimal binding av I¹²⁵-insulin; MIN: minimal binding etter konkurranse med 1 μM insulin)
- Figur 10** Ingen stimulerende aktiviteter av AK18 på IGF-IR-overuttrykkende 3T3-celler.
15
- Figur 11** Ingen stimulerende aktiviteter av AK18 på humane tumorceller (HT29).
- Figur 12** Nedregulering av IGF-IR eksponert på H322N-celleoverflate ved antistoff 18 in vitro.
- 20 **Figur 13** Behandling med AK18, primært tumorvolum
- Figur 14** Behandling med AK18 med eller uten gemcitabin
- Figur 15** Behandling med AK18, primært tumorvolum

Eksempel 1**Fremstilling av en hybridom-cellelinje som produserer anti-IGF-IR-antistoffer**

Dyrking av hybridomer

Fremstilte HuMAb-hybridomer ble dyrket i Hybridoma Express Medium (PAA

- 5 Laboratories GmbH, Østerrike) supplert med 2 mM L-glutamin (BioWhittaker) og 4% Origen Cloning Factor (Igen, Frankrike) ved 37°C og 5% CO₂.

Immuniseringsmetode for transgene mus

- 10 Ti HCo7 transgene mus (4 hanner og 6 hunner), stamme GG2201 (Medarex, San José, CA, USA) ble vekselvis immunisert med 1×10^6 NIH 3T3-celler, transfektert med en ekspresjonsvektor for IGF-IR og 20 µg løselig ekstracellulært domene av IGF-IR. Seks immuniseringer ble utført totalt, tre intraperitoneale (IP) immuniseringer med de IGF-IR-uttrykkende cellene og tre subkutane (SC) immuniseringer ved basen av halen med det rekombinante proteinet. For den første immuniseringen ble 100 µl 1×10^6 NIH 3T3 IGF-IR-
- 15 celler blandet med 100 µl complete Freund's adjuvant (CFA; Difco Laboratories, Detroit, USA). For alle andre immuniseringer ble 100 µl celler i PBS anvendt eller rekombinant protein ble blandet med 100 µl incomplete Freund's adjuvant (ICFA; Difco).

Antigenspesifikk ELISA

- 20 Anti-IGF-IR-titere i sera fra immuniserte mus ble bestemt ved antigenspesifikk ELISA. IGF-IR løselig ekstracellulært domene i en konsentrasjon på 1 µg/ml i PBS ble belagt over natten ved 4°C eller i to timer ved 37°C, på 96-brønners plater. Deretter ble brønnene blokkert med PBSTC (PBS supplert med 0,05% Tween[®]-20 og 2% kyllingserum (Gibco BRL)) i 1 time (t) ved romtemperatur. Sera fra første tapping ble fortynnet 1/50 i PBSTC,
- 25 sera fra alle andre tappinger ble på forhånd fortynnet 1/100 i PBSTC og seriefortynnet opptil 1/6400. Fortynnede sera ble tilsatt til brønnene og inkubert i 1 time ved 37°C. Forhåndstappet serum ble anvendt som negativ kontroll. 200 ng/ml geit anti-human IGF-IR (100 µg/ml) ble anvendt som positiv kontroll. Deretter ble plater vasket to ganger med PBST og inkubert med pepperrot peroksydase (HRP)-konjugert rotte anti-human IgG
- 30 F(ab')₂ (DAKO), fortynnet 1/2000 i PBSTC i 1 time ved 37°C. Brønner ble vasket to

ganger med PBST og analyser ble utviklet med nyfremstilt ABTS®-løsning (1 mg/ml) (ABTS: 2,2'-azino-bis-(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsyre) i 30 minutter ved romtemperatur (RT) i mørke. Absorbans ble målt ved 405 nm.

5 FACS-analyse

I tillegg til bestemmelse ved antigenspesifikk ELISA, ble anti-IGF-IR-titere i sera fra immuniserte mus også bestemt ved FACS-analyser. NIH 3T3 IGF-IR-celler og de ikke-transfektete NIH 3T3 IGF-IR-cellene ble inkubert med fortynnede sera i 30 minutter ved 4°C. Forhåndstappet serum ble anvendt som negativ kontroll. Initielt ble 200 ng/ml geit anti-human IGF-IR anvendt som positiv kontroll. Celler ble vasket tre ganger i PBS supplert med 1% bovint serumalbumin og 0,01% azid. Deretter ble celler inkubert med fluoresceinisotiocyanat (FITC)-konjugerte antigenbindende fragmenter (F(ab')₂-fragmenter) fra rotte anti-human human IgG fortynnet 1/100 i FACS-buffer, i 30 minutter ved 4°C. Celler ble vasket to ganger i FACS-buffer og prøver ble analysert på en FACSCalibur (Becton Dickinson, Erembodegem-Aalst, Belgia).

Boosting av mus

Når serumtitere av anti-IGF-IR ble funnet å være tilfredsstillende, ble mus i tillegg boostet to ganger med 15 µg IGF-IR ekstracellulært domene i 200 µl PBS intravenøst (i.v.) 4 og 3 dager før fusjon.

Fremstilling av hybridom

Mus ble avlivet og milten og lymfeknuter som flankerer abdominal aorta og vena cava ble oppsamlet. Fusjon av splenocytter og lymfeknuteceller med fusjonspartneren SP 2,0-celler ble utført i henhold til standard operasjonsmetoder.

κ-ELISA

- For å bestemme hvorvidt hybridomer som ble dannet ved fusjonen produserer humane antistoffer, ble det utført en κ-ELISA. ELISA-plater ble belagt med rotte anti-human IgG
- 5 κ-lett kjede-antistoff (DAKO) fortynnet 1/10000 i PBS ved inkubering over natten ved 4°C. Etter kassering av brønnene, ble plater blokkert ved inkubering med PBSTC i 1 time ved romtemperatur. Deretter ble brønner inkubert med hybridom kultur-supernatant, 1/2-fortynnet i PBSTC. Dyrkningsmedium 1/2-fortynnet i PBSTC ble anvendt som negativ kontroll, κ-lett positivt mus serum 1/100-fortynnet i PBSTC fungerte som positiv kontroll.
- 10 Deretter ble brønner vasket tre ganger og ble inkubert med HRP-konjugert rotte anti-human IgG F(ab')₂ (DAKO), fortynnet 1/2000 i PBSTC i 1 time ved 37°C. Brønner ble vasket tre ganger og analyser ble utviklet med nyfremstilt ABTS[®]-løsning (1 mg/ml) i 30 minutter ved romtemperatur (RT) i mørke. Absorbans ble målt ved 405 nm i en ELISA-plateleser.
- 15 De monoklonale antistoffene 18 og 22 ble fremstilt.

Eksempel 2

Bestemmelse av affiniteten for anti-IGF-IR-antistoffer mot IGF-IR

- 20 Instrument: BIACORE[®] 3000
 Chip: CM5
 Kobling: amin kobling
 Buffer: HBS (HEPES, NaCl), pH 7,4, 25°C
- 25 For affinitetsmålinger har anti human FCγ-antistoffer (fra kanin) blitt koblet til chip-overflaten for presentasjon av antistoffet mot IGF-IR. IGF-IR ekstracellulært domene ble tilsatt i forskjellige konsentrasjoner i løsning. Assosiering ble målt ved en IGF-IR-injeksjon på 3 minutter; dissosiering ble målt ved vasking av chip-overflaten med buffer i 5 minutter. Affinitetsdataene for antistoffene 18 og 22 er vist i Tabell 1.

Tabell 1:
Affinitetsdata målt ved SPR (BIAcore® 3000)

Antistoff	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
18	$1,49 \times 10^5$	$1,03 \times 10^{-7}$	$6,95 \times 10^{-13}$
22	$1,47 \times 10^5$	$9,64 \times 10^{-5}$	$6,56 \times 10^{-10}$

Eksempel 3

- 5 Tredimensjonal vekst av tumorceller og overekspresjon av IGF-I-reseptor ved celle-cellekontakt (3D-kultur)

Materialer og Metoder:

- NCI H322M-celler ble dyrket i RPMI-media på glass cover slides av optisk kvalitet enten ved lav tetthet eller superkonfluens for å undersøke effektene på IGF-IR overflate-
- 10 ekspresjon. Parellellt ble H322M xenograft vev isolert fra kontrollgruppen (ubehandlede mus) ”sjokkfrosset” i isopentan og kryosnitt ble kuttet med 5µm tykkelse.
- Immunfluorescens-merking ble utført ved anvendelse av et mus-anti IGF-IR monoklonalt antistoff (α IR3, 5µg/ml) eller et antistoff ifølge beskrivelsen, fulgt av et geit anti-mus-antistoff eller et geit anti-mus antistoff merket med Cy3 (Amersham Biosciences, GB) eller
- 15 Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes, Inc., USA). Prøver ble avbildet i et Leica SP2 konfocalt mikroskop eller analysert ved FACS.

Resultater:

- Når H322M-celler dyrket ved høy tetthet ble avbildet ved konfokal mikroskopi var det
- 20 tydelig at IGF-IR samlet seg spesifikt ved setene for celle-celle-kontakt. Ved sammenligning med H322M-celler dyrket in vivo, dvs. xenograft vev, var det en påfallende likhet med tett pakkede in vitro-kulturer med hensyn til organiseringen av overflate IGF-I-reseptorer.
- 25 Oppreguleringen av overflate IGF-I-reseptor i super-konfluente kulturer av H322M-celler ble også kvantifisert ved FACS. IGF-I-reseptor overflateekspresjon økte mer enn 10 ganger når celler ble dyrket under betingelser med høy tetthet sammenlignet med lav tetthet uten betydelig celle-celle-kontakter.

Andre tumorceller slik som HT29, MDA231 og MCF-7 viste en lignende atferd, hvilket indikerer at oppregulering av IGF-I-reseptorer på celleoverflaten etter etablering av celle-celle kontakt-seter ikke er et unikt trekk for H322M-celler men synes å være en generell egenskap for en mer vevslignende organisering som også er funnet in vivo (Fig. 1).

Eksempel 4

Veksthemming av H322M-tumorceller som uttrykker IGF-IR i 3D-kultur under behandling med antistoff 18 (WST-analyse)

H322M-celler ble dyrket i RPMI1640/0,5% FCS-media i poly-HEMA (poly(2-hydroksyetylmetakrylat))-belagte skåler for å forhindre adheranse til plastoverflaten. Under disse betingelsene danner H322M-celler tette sfæroider som vokser tredimensjonalt (en egenskap som betegnes forankrings-uavhengighet). Disse sfæroidene ligner svært mye på den tredimensjonale strukturen ("histoarchitecture") og organiseringen av faste tumorer in situ. Sfæroide kulturer ble inkubert i 5 dager i nærvær av økende mengder av antistoffer fra 0-240 nM. WST omdannelses-analysen ble anvendt for å måle hemming av vekst. Når sfæroide H322M-kulturer ble behandlet med forskjellige konsentrasjoner av antistoff 18 (1-240 nM) kunne det observeres en doseavhengig hemming av vekst (Fig. 2).

Eksempel 5

Veksthemming av H322M-tumorceller som uttrykker IGF-IR i 3D kultur (kolonidannelse-analyse)

H322M-celler ble dyrket i RPMI1640/10% NCS-media i poly-HEMA-belagte skåler for å forhindre adheranse til plastoverflaten. Under disse betingelsene danner H322M-celler tette sfæroider som vokser tredimensjonalt (en egenskap som betegnes forankrings - uavhengighet). Disse sfæroidene representerer den tredimensjonale strukturen og organiseringen av faste tumorer in situ. Sfæroide kulturer ble inkubert i 5-10 dager i nærvær av økende mengder av antistoffer fra 0-7,5µg/ml. <HBV> monoklonalt antistoff ble anvendt som neg. kontroll. Kolonier ble avbildet i et invertert mikroskop (Zeiss Axiovert) ved anvendelse av fasekontrast og tellet ved anvendelse av et automatisert avbildningssystem (MetaMorf). Når sfæroide H322M-kulturer ble behandlet med forskjellige konsentrasjoner (0,5-7,5µg/ml) av antistoff 18, kunne det observeres en doseavhengig hemming av vekst, mens kontrollantistoffet <HBV> hadde liten eller ingen

effekt. Både antallet og størrelsen av kolonier ble tydelig redusert i kulturer behandlet med 7,5µg/ml antistoff 18 (Fig. 3).

5 Kvantitativ analyse av kolonier større enn 100µm i diameter viste at antall kolonier ble redusert ca. 66% i kulturer behandlet med 0,5µg/ml antistoff 18 (Fig. 4).

Eksempel 6

Hemming av IGF-I og IGF-II-binding til tumorceller som uttrykker IGF-IR

10 For å bestemme evnen til antistoffet ifølge foreliggende beskrivelse til å blokkere binding av ligandene IGF-I og IGF-II til IGF-I-reseptoren (IGF-IR), ble det utført konkurranseforsøk med radioaktivt merkede ligandpeptider.

Humane tumorceller (HT29, NCI H322M, 0,5 til 1×10^5 /ml) ble platet ut i RPMI 1640-medium (PAA, Kat. nr. E15-039) supplert med 2 mM L-Glutamin, 1x ikke-essensielle aminosyrer (Gibco, Kat. nr. 11140-035), 1 mM natriumpyruvat (Gibco, Kat. nr. 11360-039) og 10% varmeinaktivert FCS (PAA, Kat. nr. A15-771). Seks flasker i T175-formatet ble inokulert med 20 ml celler i det respektive mediet for hvert forsøk og dyrket i to dager ved 37°C og 5% CO₂ for å oppnå konfluente celle-monolag.

20 For å oppsamle individuelle celler, ble 2 ml 1x Trypsin/EDTA (Gibco, Kat. nr. 25300-054) pr. T175-kolbe tilsatt og løsrivelse av celler overvåket med et Zeiss Axiovert25-mikroskop. Cellene ble oppsamlet og medium med 10% FCS som beskrevet tidligere ble tilsatt til et totalt volum på 50 ml. Celler ble reisolert ved sentrifugering i 10 minutter ved 1000 rpm (Heraeus sepatech, Omnifuge 2,0 RS) og resuspendert i 50 ml bindingsbuffer
25 (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 1 mM EDTA, 10 mM D(+)glukose, 15 mM NaAc, 100 mM Hepes pH 7,6, 1% BSA). Celler ble talt, reisolert ved sentrifugering og justert med bindingsbuffer til 1×10^6 celler/ml.

30 I¹²⁵-merkede IGF-I og IGF-II-peptider (Amersham, ~2000 Ci/mmol, Kat. nr. IM172 og IM238), solubilisert i 0,1% CH₃COOH, ble fortynnet i bindingsbuffer til en endelig aktivitet på 4×10^5 tellinger/(minutt x ml). 75 µl antistoff ved de spesifiserte konsentrasjonene sammen med 25 µl forhåndsfortynnet I¹²⁵-merket IGF-I eller IGF-II-peptid ble tilsatt til 200 µl av cellesuspensjon og inkubert i 3,5 timer ved 4°C. Celler ble

reisolert ved sentrifugering i 5 minutter ved 2000 rpm (Eppendorf, 5415C) og supernatanten fjernet. Etter vasking to ganger i 1 ml bindingsbuffer, ble celler resuspendert i 1 ml bindingsbuffer og overført til scintillasjonsrør. Mengden av radioaktivt peptid bundet til celleoverflatereseptorene ble målt i en scintillasjonsteller.

5

De resulterende IC_{50} -kurvene som viser antistoffets evne til å hemme binding av IGF-I og IGF-II-peptid til IGF-I-reseptoren er vist i Figurene 5 og 6. Den gjennomsnittlige IC_{50} -verdien for antistoff 18 er 0,3 nM. Resultatene for antistoff $\alpha IR3$ er vist i Fig. 7. Ingen detekterbar hemming av IGF-II-binding kunne observeres.

10

Eksempel 7

Antistoff-konkurransforsøk for IGF-IR-binding

For en epitop-kartlegging ("mapping") av anti-IGF-IR monoklonale antistoffer ble det valgt et lignende format som for affinitetsmåling (Eksempel 2), men IGF-IR ble pre-inkubert i minst 0,5 time ved RT med antistoffet i løsning. Denne blandingen ble injisert og IGF-IR-binding (eller hemming) ble detektert. Dette forsøket tillater måling av den resiproke hemmende aktiviteten av monoklonale antistoffer for IGF-IR-binding. Det ble funnet at antistoffene ifølge beskrivelsen konkurrerer om binding til IGF-IR med $\alpha IR3$, et antistoff som er kjent å binde til aa 217-274 (Gustafson, T.A. og Rutter, W.J., J. Biol. Chem. 265 (1990) 18663-18667).

20

Eksempel 8

Inhibering av IGF-I-mediert fosforylering av IGF-IR og Akt/pkB

For å bestemme evnen til antistoffet ifølge beskrivelsen til å hemme aktivering og fosforylering av IGF-I-reseptoren (IGF-IR), ble konkurranseforsøk utført med IGF-I-peptid og påfølgende Western blotting-analyse med antistoffer spesifikke for fosforylert tyrosin.

25

Humane tumorceller (HT29, NCI H322M, 5×10^4 /ml) ble platet ut i RPMI 1640-medium (PAA, Kat. nr. E15-039) supplert med 2 mM L-Glutamin, 1x ikke-essensielle aminosyrer (Gibco, Kat. nr. 11140-035), 1 mM natriumpyruvat (Gibco, Kat. nr. 11360-039) og 0,5% varmeinaktivert FCS (PAA, Kat. nr. A15-771). For bestemmelse av IC_{50} -verdier, ble 12-

30

brønners plater inokulert med 1 ml celler i det respektive mediet for hvert forsøk og dyrket i to dager ved 37°C og 5% CO₂.

Etter 48 timers dyrkning med lav serum-medium, ble mediet forsiktig fjernet og erstattet av
5 forskjellige konsentrasjoner av antistoff fortynnet i det respektive mediet. Etter 5 minutters
inkubering ved 37°C og 5% CO₂ ble IGF-I-peptid tilsatt i en endelig konsentrasjon på 2
nM og celler ble igjen inkubert i 10 minutter under betingelsene nevnt ovenfor. Mediet ble
forsiktig fjernet ved aspirering og 100 µl kald lysis-buffer ble tilsatt pr. brønn (50mM
Hepes pH 7,2, 150 mM NaCl, 1mM EGTA, 10% glyserol, 1% Triton[®]-X100, 100mM
10 NaF, 10 mM Na₄P₂O₇, Complete[®] proteaseinhibitor). Cellene ble løsnet ved anvendelse av
en celskraper (Corning, Kat. nr. 3010) og innholdet i brønnene overført til Eppendorf
reaksjonsrør. Cellefragmenter ble fjernet ved sentrifugering i 10 minutter ved 13000 rpm
og 4°C og halvparten av supernatanten ble tilsatt til 2x Laemmli prøve-buffer i en 1:1
(volum/volum)-ratio. For immunpresipitering av IGF-IR, gjennomgikk den gjenværende
15 supernatanten fra cellelysater et rensende spinn (10 minutter ved 13000 rpm og 4°C) like
før 1 µl av et polyklonalt antistoff mot IGF-IRβ (C-20, Santa Cruz Biotechnologies) eller
et murint monoklonalt antistoff (IgG1) som gjenkjenner en epitop innenfor aminosyrene
440-586 av det ekstracellulære domenet (α-kjede) av den humane IGF Type 1-Reseptor ble
tilsatt (mAb 24-55, GroPep). Etter 2 timers inkubering ved 4°C i et roterende Eppendorf
20 reaksjonsrør, ble 25 µl Protein G Sepharose[®]-kuler (Amersham Biosciences, Kat. nr. 17-
0618-01) tilsatt etterfulgt av et andre inkuberingstrinn på 1 time ved 4°C. Kulene med
bundne antistoff-protein-komplekser ble isolert ved sentrifugering (1 minutt ved 2000 rpm
og 4°C) og vasket tre ganger med vaskebuffer (lysis-buffer med kun 0,1% Triton[®]-X100).
Etter koking av kulene i Laemmli prøve-buffer, ble cellulære proteiner separert ved SDS-
25 PAGE og overført til en nitrocellulosemembran (PROTRAN[®] BA 85, Schleicher&Schuell)
ved semi-tørr Western blotting.

Et fosfotyrosin-spesifikt antistoff (Upstate, klon 4 G10, Kat. nr. 05-321) ble anvendt for å
bestemme fosforylerings-status for immunrenset IGF-IR. For deteksjon av fosforylert
30 Akt/pkB ble det anvendt et antistoff med spesifisitet for fosforylert Ser473 (Cell Signaling,
Kat. nr. 9271).

Den observerte blokkeringen av IGF-I-indusert fosforylering av både IGF-IR og Akt/pkB er vist i Fig. 8.

Eksempel 9

5 Induksjon av antistoffmediert nedregulering av IGF-IR in vitro

For å detektere effekter av antistoffet ifølge beskrivelsen på mengden av IGF-I-reseptor (IGF-IR) i tumorceller, ble tidsforløp-eksperimenter og påfølgende western blotting-analyse med IGF-IR-spesifikke antistoffer utført.

- 10 Humane tumorceller (HT29, 5×10^4 celler/ml) i RPMI 1640-medium (PAA, Kat. nr. E15-039) supplert med 2 mM L-Glutamin, 1x ikke-essensielle aminosyrer (Gibco, Kat. nr.11140-035), 1 mM natriumpyruvat (Gibco, Kat. nr. 11360-039) og 10% varmeinaktivert FCS (PAA, Kat. nr. A15-771). For hver inkuberingsperiode ble én 12-brønners plate inokulert med 1 ml celler i det respektive mediet for hvert forsøk og dyrket i 24 timer ved
- 15 37°C og 5% CO₂.

- Mediet ble forsiktig fjernet og erstattet av forskjellige konsentrasjoner av antistoff fortynnet i det respektive mediet. I to kontroll-brønner, ble medium erstattet av enten medium uten antistoff eller medium med et kontroll-antistoff (AB-1, Oncogene, Kat. nr.
- 20 GR11). Celler ble inkubert ved 37°C og 5% CO₂ og individuelle plater ble tatt ut for videre prosessering etter 15 minutter, 24 timer og 48 timer.

- Mediet ble forsiktig fjernet ved aspirering og 100 µl kald lysis-buffer ble tilsatt pr. brønn (50mM Hapes pH 7,2, 150 mM NaCl, 1mM EGTA, 10% glyserol, 1% Triton[®]-X100,
- 25 100mM NaF, 10 mM Na₄P₂O₇, Complete[®] proteaseinhibitor). Cellene ble løst ved anvendelse av en celleskraper (Corning, Kat. nr. 3010) og innholdene i brønnene overført til Eppendorf reaksjonsrør. Cellefragmenter ble fjernet ved sentrifugering i 10 minutter ved 13000 rpm og 4°C og supernatanten ble tilsatt til 2x Laemmli prøve-buffer i en ratio på 1:1 (volum/volum). Cellulære proteiner ble separert ved SDS-PAGE og overført til en
- 30 nitrocellulosemembran (PROTRAN[®] BA 85, Schleicher&Schuell, Kat. nr. 10 401196) by semi-tørr western blotting.

Et antistoff spesifikt for IGF-IR (C-20, Santa Cruz Biotechnologies, Kat. nr. sc-713) ble anvendt for å bestemme proteinnivåer av IGF-IR.

- 5 Nedregulering av IGF-IR indusert av antistoffet ifølge foreliggende beskrivelse etter mindre enn 24 timer etter tilsetning av antistoffet ble observert.

Eksempel 10

Hemming av insulinbinding til 3T3-celler som uttrykker human insulinreseptor

- 10 For å bestemme hvorvidt antistoffet ifølge foreliggende beskrivelse også blokkerer binding av insulin til insulinreseptoren (IR), ble konkurranseforsøk utført med et radioaktivt merket ligand-peptid.

- 15 3T3-celler (1×10^5 /ml) som rekombinant uttrykker høye antall ($>10^5$) human IR ble platet ut i MEM Dulbecco medium (DMEM) med høy glukose (PAA, Kat. nr. E15-009) supplert med 2mM L-Glutamin (Gibco, Kat. nr. 25030-024) og 10% varmeinaktivert FCS (PAA, Kat. nr. A15-771). Seks flasker i T175-formatet ble inokulert med 20 ml celler i det respektive mediet for hvert forsøk og dyrket i to dager ved 37°C og 5% CO₂ for å oppnå konfluente celle-monolag.

- 20 For å oppsamle individuelle celler, ble 2 ml 1x Trypsin/EDTA (Gibco, Kat. nr. 25300-054) pr. T175-kolbe tilsatt og løsning av celler overvåket med et mikroskop. Cellene ble oppsamlet og medium med 10% FCS som beskrevet tidligere ble tilsatt til et totalt volum på 50 ml. Celler ble reisolert ved sentrifugering i 10 minutter ved 1000 rpm og resuspendert i 50 ml bindingsbuffer (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 1 mM EDTA, 10 mM D(+)glukose, 15 mM NaAc, 100 mM Hepes pH 7,6, 1% BSA). Celler ble
25 tallet, reisolert ved sentrifugering og justert med bindingsbuffer til 1×10^6 celler/ml.

- 30 I¹²⁵-merket insulin-peptid (Amersham, Kat. nr. IM166, ~2000 Ci/mmol), solubilisert i 0,1% CH₃COOH, ble fortynnet i bindingsbuffer til en endelig aktivitet på 4×10^5 tellinger/(minutt*ml). 75 µl antistoff sammen med 25 µl forhåndsfortynnet I¹²⁵-merket insulin-peptid ble tilsatt til 200 µl cellesuspensjon (endelig antistoffkonsentrasjon 200 nM) og inkubert i 3,5 timer ved 4°C. Celler ble reisolert ved sentrifugering i 5 minutter ved 2000 rpm og supernatant ble fjernet. Etter vasking to ganger i 1 ml bindingsbuffer, ble

celler resuspendert i 1 ml bindingsbuffer og overført til scintillasjonsrør. Mengden av radioaktivt peptid bundet til celleoverflatereseptorene ble målt ved en scintillasjonsteller. Resultatene viser at antistoffet ifølge beskrivelsen ikke interfererer med binding av insulinligand til insulinreseptoren (Fig. 9).

5

Eksempel 11

Ingen stimulering av IGF-IR og Akt/PKB-fosforylering

For å utelukke IGF-IR-stimulerende aktiviteter av antistoffet ifølge foreliggende beskrivelse, ble fosforylering av IGF-IR bestemt i fravær av IGF-I-ligand men i nærvær av antistoffet ifølge beskrivelsen og et referanseantistoff (α IR3, Oncogene, Tyskland). Dette ble utført ved en western blotting-analyse med fosforylerings-status spesifikke antistoffer. 3T3-celler (ATCC CRL 1658) transfektert med IGF-IR ($5 \cdot 10^4$ celler/ml, Pietrzkowski, Z., et al., Cell Growth Differ. 4 (1992) 199-205) ble platet ut i MEM Dulbecco medium (DMEM) med høy glukose (PAA, Kat. nr. E15-009) supplert med 2mM L-Glutamin (Gibco, Kat. nr. 25030-024) og 0,5% varmeinaktivert FCS (PAA, Kat. nr. A15-771) eller humane tumorceller (HT29, NCI H322M, $5 \cdot 10^4$ /ml) i RPMI 1640-medium (PAA, Kat. nr. E15-039) supplert med 2 mM L-Glutamin, 1x ikke-essensielle aminosyrer (Gibco, Kat. nr. 11140-035), 1 mM natriumpyruvat (Gibco, Kat. nr. 11360-039) og 0,5% varmeinaktivert FCS (PAA, Kat. nr. A15-771). For bestemmelse av IC_{50} -verdier, ble 12-brønners plater inokulert med 1 ml celler i det respektive mediet for hvert forsøk og dyrket i to dager ved 37°C og 5% CO_2 .

Etter 48 timers dyrkning med lav serum-medium, ble mediet forsiktig fjernet og erstattet av forskjellige konsentrasjoner av antistoff fortynnet i det respektive mediet. Celler ble inkubert i 15 minutter under betingelsene nevnt ovenfor. Mediet ble forsiktig fjernet ved aspirering og 100 μ l kald lysis-buffer ble tilsatt pr. brønn (50mM HEPES pH 7,2, 150 mM NaCl, 1mM EGTA, 10% glyserol, 1% Triton-X100, 100mM NaF, 10 mM $Na_4P_2O_7$, Complete™ proteaseinhibitor). Cellene ble løsnet ved anvendelse av en celledraper (Corning, Kat. nr. 3010) og innholdet i brønnene overført til Eppendorf-reaksjonsrør. Cellefragmenter ble fjernet ved sentrifugering i 10 minutter ved 13000 rpm og 4°C (Eppendorf centrifuge 5415R) og halvparten av supernatanten ble tilsatt til 2x Laemmli prøve-buffer i en ratio på 1:1 (volum/volum). For immunpresipitering av IGF-IR, gjennomgikk den gjenværende supernatanten fra cellelysater et rensende spinn (10

minutter ved 13000 rpm og 4°C) like før 1 µl av et antistoff mot IGF-IR ble tilsatt (C-20, Santa Cruz Biotechnologies, Kat. nr. sc-713 eller mAb 24-55, GroPep, Kat. nr. MAD1). Etter 2 timers inkubering ved 4°C i et roterende Eppendorf reaksjonsrør, ble 25 µl Protein G Sepharose™-kuler (Amersham Biosciences, Kat. nr. 17-0618-01) tilsatt fulgt av et andre
 5 inkuberingstrinn på 1 time ved 4°C. Kulene med bundne antistoff-protein-komplekser ble isolert ved sentrifugering (1 minutt ved 2000 rpm og 4°C) og vasket tre ganger med vaskebuffer (lysis-buffer med kun 0,1% Triton-X100). Etter koking av kulene i Laemmli prøve-buffer, ble cellulære proteiner separert ved SDS-PAGE og overført til en
 10 nitrocellulosemembran (PROTRAN BA 85, Schleicher&Schuell, Kat. nr. 10 401196) ved semi-tørr western blotting.

Et fosfotyrosin-spesifikt antistoff (Upstate klon 4 G10, Kat nr. 05-321, som gjenkjenner tyrosin-fosforylerte proteiner) ble anvendt for å bestemme fosforyleringsstatus for immunrenset IGF-IR. For deteksjon av fosforylert Akt/PKB ble det anvendt et antistoff
 15 mot Akt1 med spesifisitet for fosforylert Ser473 (Cell Signalling, Kat. nr. 9271).

Det ble observert at Akt/PKB-kinasen nedstrøm i signaloverføringsbanen for IGF-IR ble betydelig aktivert ved referanse-antistoffet ved konsentrasjoner høyere enn 5 nM men ikke ved antistoffet ifølge foreliggende oppfinnelse ved konsentrasjoner opptil 10,000 nM.
 20 Resultatene er vist i Figurene 10 og 11 (HM=lav serum medium med 0,5% FCS, HM+HGFI=lav serum medium med 0,5% FCS og 10 nM hIGF-I).

Eksempel 12

Induksjon av reseptor-nedregulering i H322M xenograft-modeller

25 Tumorer ble indusert i nakne mus og behandlet én gang med forskjellige konsentrasjoner av antistoffet ifølge foreliggende beskrivelse. 24 timer etter behandling ble tumorene ekstrahert og homogenisert under flytende nitrogen. Kald lysis-buffer ble tilsatt (50mM Hepes pH 7,2, 150 mM NaCl, 1mM EGTA, 10% glyserol, 1% Triton-X100, 100mM NaF, 1 mM Na₃V₀₄, 10 mM Na₄P₂O₇, Complete™ proteaseinhibitor, 1mM PMSF) i en buffer-
 30 volum til tumor-vekt-ratio på 3:1 og grundig blandet med det opptinte tumor-homogenatet. Etter solubilisering av vevet i 15 minutter på is, ble uløselige fragmenter fjernet ved sentrifugering i 10 minutter ved 13000 rpm og 4°C (Eppendorf centrifuge 5415R). Proteinkonsentrasjonen av prøvene ble bestemt med Mikro BCA™ Reagents (Pierce) og

lysis-buffer ble tilsatt for å justere like konsentrasjoner. Del av supernatanten ble tilsatt til 2x Laemmli prøve-buffer i en ratio på 1:1 (volum/volum). Cellulære proteiner ble separert ved SDS-PAGE og overført til en nitrocellulosemembran (PROTRAN BA 85, Schleicher&Schuell, Kat. nr. 10 401196) ved semi-tørr western blotting. Et IGF-IR-spesifikt antistoff (C-20, Santa Cruz Biotechnologies, Kat. nr. sc-713) ble anvendt for å

5 detektere IGF-IR.

Etter behandling med antistoffet ifølge beskrivelsen, observerte vi en konsentrasjonsavhengig reduksjon av IGF-IR-nivåer med en beregnet EC50 på 0,6 mg/kg

10 (Figur 12).

Eksempel 13

C1q bindings-ELISA

Innføring

15 For å bestemme evnen for antistoffer ifølge foreliggende beskrivelse til å binde C1q ble det anvendt en ELISA-metode. C1q er del av det adaptive immunsystemet og trigger, etter binding til immunkomplekser, den sekvensielle aktiveringen av mange zymogener. Enzymene bevirker i sin tur kløyving av C3-molekyler, hvilket kan føre til oppstart av inflammatoriske reaksjoner, opsonisering av fremmede eller abnorme partikler og lysering

20 av cellemembraner.

I prinsippet belegges ELISA-platen med konsentrasjons-spektre av antistoffet, til hvilket human C1q tilsettes. C1q-binding detekteres av et antistoff rettet mot human C1q etterfulgt av et peroksydase-merket konjugat.

25

Materialer og metoder

Antistoff 18, 8 og 23 og kontroll-antistoffer ble testet i konsentrasjoner på 10, 5, 1 og 0,5 µg/ml. Tabell 1 viser spesifisitetene av prøvene som ble testet. Som en negativ kontroll ble det anvendt et humant IgG4 (CLB, stock 0,5 µg/ml), som binder C1q svært svakt. Human

30 IgG1 ble inkorporert som positiv kontroll. Human C1q-stamløsning med en konsentrasjon

på 2 µg/ml ble anvendt. For deteksjon av C1q ble det anvendt et kanin-antistoff rettet mot C1q (Dako) og et anti-kanin IgG-antistoff, konjugert til pepperrot peroksydase (Sigma).

Beregninger og kurvetilpasning

- 5 Beregninger angående maksimal binding (Bmaks) av HuMAb testet ble bestemt ved anvendelse av ikke-lineær regresjon kurvetilpasning (ett sete binding) ved anvendelse av Graphpad Prism-programvare.

Resultater

- 10 Antistoffene ifølge foreliggende beskrivelse oppviser doseavhengig binding av humant C1q-protein. Den optiske tettheten ved 405 nm (OD 405 nm) ble plottet mot konsentrasjonene av HuMAb og kurvene ble tilpasset ved anvendelse av ikke-lineær regresjon. Beste tilpasnings ("best fit")-verdier for maksimal binding (Bmaks) er listet opp i Tabell 2, i likhet med korrelasjonskoeffisienten av kurven (R²) og standardavviket for
- 15 hver verdi. Den laveste korrelasjonskoeffisienten hadde en verdi på 0,950 (IgG4). Med en maksimal binding på 0,279, oppviser human IgG4 (negativ kontroll) minimum binding av C1q. Positive kontroller IgG1 og IgG3 binder begge C1q, som vist ved en maksimal binding på 1,729 og 2,223, henholdsvis.

Tabell 2

- 20 **Maksimal binding (Bmaks) av HuMAb testet i C1q-bindings-ELISA (n=3)**

Best fit-verdier	Bmaks	Standardavvik Bmaks	"Goodness of fit" R²	Standardavvik 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
Antistoff 18	1,670	0,601	0,988	0,005

Korrelasjonskoeffisienten (R²) og standardavviket er også listet opp.

Sammenlignet med C1q-bindingen av human IgG4 (negativ kontroll, med en O.D. på 0,279), er alle de testede antistoffene i like stor grad i stand til å binde C1q.

Eksempel 14

5 Bestemmelse av antistoffmedierte effektorfunksjoner ved anti-IGF-IR HuMAbs

For å bestemme kapasiteten for de dannede HuMAb-antistoffene til å fremkalle immun effektor-mekanismer, ble det utført komplementavhengig cytotoxicitet (CDC) og antistoff-avhengig celle-cytotoxicitet (ADCC)-undersøkelser.

- 10 For å undersøke CDC (National Cancer Institute, lunge adenokarsinom-cellelinje), ble H322M, H460 og NIH 3T3-celler ($2-6 \times 10^6$) merket med $100 \mu\text{Ci } ^{51}\text{Cr}$ i 45-120 minutter (Amersham Pharmacia Biotech, UK, Kat CJS11). Etter merking ble cellene vasket to ganger med 40 ml PBS og spunnet i 3 minutter ved 1500 rpm. Cellene ble deretter platet ut med 5,000 pr. brønn i en rundbunnet plate, i et volum på $50 \mu\text{l}$. Antistoffer ble tilsatt til en
- 15 endelig konsentrasjon i området fra 25-0,1 $\mu\text{g/ml}$ i et volum på $50 \mu\text{l}$ celledyrkningsmedium til $50 \mu\text{l}$ cellesuspensjon og inkubert i 30-60 minutter. Etter inkubering ble overskudd av antistoff fjernet ved vasking to ganger med PBS. $100 \mu\text{l}$ aktivt eller inaktivt (30 minutter ved 56°C) samlet humant serum, eller serum fra marsvin, kanin eller nakne mus fortynnet mellom 1/3-1/30 ble tilsatt og cellene ble inkubert i 3 timer,
- 20 hvoretter cellene ble spunnet ned ved 1500 rpm i 3 minutter. $100 \mu\text{l}$ av supernatanten ble høstet, overført til polypropylenrør og tallet i en γ -counter.

- For å undersøke virkningene av antistoffene i ADCC, ble H322M, H460 og NIH 3T3 eller andre passende IGF-IR-uttrykkende celler ($2-6 \times 10^6$) merket med $100 \mu\text{Ci } ^{51}\text{Cr}$ i 45-120
- 25 minutter (Amersham Pharmacia Biotech, UK, Kat CJS11), vasket to ganger med 40 ml PBS og spunnet i 3 minutter ved 1500 rpm. Cellene ble platet ut med 5,000 pr. brønn i en rundbunnet plate, i et volum på $50 \mu\text{l}$. HuMAb-antistoffer ble tilsatt til en endelig konsentrasjon i området fra 25-0,1 $\mu\text{g/ml}$ i et volum på $50 \mu\text{l}$ celledyrkningsmedium til $50 \mu\text{l}$ cellesuspensjon og inkubert i 15 minutter. Deretter ble $50 \mu\text{l}$ effektorceller, nysisolerte
- 30 PBMC eller rensede effektorceller fra buffycoats, tilsatt ved en E:T-ratio i området fra 100:1 til 5:1. Platene ble sentrifugert i 2 minutter ved 500-700 rpm og inkubert over natten ved 37°C . Etter inkubering ble cellene spunnet ned i 3 minutter ved 1500 rpm og $100 \mu\text{l}$ supernatant ble høstet, overført til polypropylenrør og tallet i en γ -counter.

Omfatning av cellelysis ved CDC eller ADCC er uttrykt som % av maksimal frigjøring av radioaktivitet fra målcellene lysert ved detergent korrigeret for spontan frigjøring av radioaktivitet fra de respektive målcellene.

5

Eksempel 15

Veksthemming av H322M-tumorer

Virkningene av antistoff 18 in vivo ble undersøkt ved å indusere tumorer i atymiske nakne mus i henhold til etablerte metoder. Humane H322M NSCLC-celler ble injisert sammen med Matrigel subkutant inn i 6-7 uker gamle atymiske nu mus (nu/nu). I den hensikt ble 5 5×10^6 H322M-celler konsentrert i 100 μ l dyrkningsmedium og blandet med 100 μ l Matrigel. 200 μ l av denne blandingen ble injisert inn i de høyre flankene hos musen. Tumorum volum ble beregnet ved å måle tumordiameterene med Vernier skyvelær to ganger pr. uke i henhold til formelen først publisert av Geran et al. ("Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems", Cancer Chemother. Rep. 11,301, 1972) hvor tumorum volum [mg] = (lengde x (bredde)²). Antistoff ble administrert intraperitonealt (i.p.) ved 10 ml/ kg. Behandling ble startet med fordoblede doser av antistoffet administrert i fordoblede volumer. Tumorer ble indusert i nakne mus som beskrevet ovenfor. Etter at tumorer hadde vokst til et gjennomsnittlig volum på 160 mg, ble mus behandlet intraperitonealt seks ganger én gang pr. uke med 6, 0,6 og 0,06 mg/kg antistoff som påfølgende doser ved å starte med 12, 1,2 og 0,12 mg/kg som loading dose gitt én gang den første dagen for behandling. Figur 13 illustrerer tumorum volumer målt under behandling inntil dag 67, da dyrene ble avlivet og forsøket ble avsluttet. Forsøket viser at blokkering av IGF-IR-aksen ved rhu anti-IGF-IR mAb 18 resulterer i antitumoral effektivitet når administrert som et enkelt agens ved 6 og 0,6 mg/kg. I motsetning hadde 0,06 mg/kg ikke noen effekt på tumorvekst.

I tillegg ble antistoff 18 testet i kombinasjon med gemcitabin i samme modell. Tumorer ble indusert som beskrevet ovenfor og behandling ble initiert når tumorer var etablert og hadde vokst til gjennomsnittlig 170mm³ i alle gruppene. Antistoff ble administrert én gang pr. uke i.p. ved 6 og 0,6 mg/kg og i kombinasjon med 62 mg/kg gemcitabin ved 0,6 mg. Gemcitabin ble administrert i én syklus dvs. hver tredje dag, totalt fire ganger. Igjen ble behandling oppstartet ved administrering av fordoblede doser av antistoffet. Figur 14 viser

30

tumorstørrelsen i relasjon til de forskjellige behandlingene over tid. Forsøket viste at behandling med antistoff 18 administrert én gang hver syvende dag hemmer tumorvekst alene og forøker effektiviteten av gemcitabin, en kjent antimetabolsk forbindelse.

5 **Eksempel 16**

Veksthemming av 3T3-tumorer

Tumorer ble induert i nakne mus hovedsakelig som beskrevet i Eksempel 15 bortsett fra at murine 3T3-fibroblaster som overuttrykker den humane IGF-IR ble anvendt. Mus med etablerte tumorer på omtrent 180 mg ble behandlet intraperitonealt én gang ukentlig syv
10 ganger med 18, 6 eller 0,6 mg/kg av antistoff 18. Igjen ble behandling startet med doblede doser av antistoff gitt som loading dose (36, 12 og 1,2 mg/kg). Forsøket viser at ved behandling med antistoffet, kan tumorvekst forsinkes ved administrering ved 18 og 6 mg/kg én gang ukentlig (Figur 15).

Liste over referanser

- Adams, T.E., et al., *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1050-1063
- Aplin, J.D. og Wriston, J.C. Jr., *CRC Crit. Rev. Biochem.* (1981) 259-306
- 5 Arteaga, C.L., et al., *Breast Cancer Res. Treatment* 22 (1992) 101-106
- Ausubel, F., et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing og Wiley Interscience, New York (1987)
- Barnes, L.M., et al., *Biotech. Bioeng.* 73 (2001) 261-270
- Barnes, L.M., et al., *Cytotechnology* 32 (2000) 109-123
- 10 Benini, S., et al., *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 1790-1797
- Berge, S.M., et al., *J. Pharm. Sci.* 66 (1977) 1-19
- Bergmann, U., et al., *Cancer Res.* 55 (1995) 2007-2011
- Brüggemann, M., et al., *J. Exp. Med.* 166 (1987) 1351-1361
- Brunetti, A., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165 (1989) 212-218
- 15 Carter, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289
- Chen, J., et al., *EMBO J.* 12 (1993) 821-830
- Chen, J., et al., *International Immunology* 5 (1993) 647-656
- Delafontaine, P., et al., *J. Mol. Cell Cardiol.* 26 (1994) 1659-1673
- Dricu, A., et al., *Glycobiology* 9 (1999) 571-579
- 20 Durocher, Y., et al., *Nucl. Acids Res.* 30 (2002) E9
- Edge, A.S., et al. *Anal. Biochem.* 118 (1981) 131-137
- Fishwild, D.M., et al., *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 845-851
- Forsayeth, J.R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 3448-3451
- Geisse, S., et al., *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-282
- 25 Gustafson, T.A. og Rutter, W.J., *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 18663-18667
- Hailey, J., et al., *Mol. Cancer Ther.* 1 (2002) 1349-1353
- Harding, F. og Lonberg, N., *Ann. N. Acad. Sci.* 764 (1995) 536-546
- Hoyne, P.A., et al., *FEBS Lett.* 469 (2000) 57-60
- Johnson, G. og Wu, T.T., *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 214-218
- 30 Jones, P., et al., *Nature* 321 (1986) 522-525
- Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)
- Kalebic, T., et al., *Cancer Res.* 54 (1994) 5531-5534
- Kanter-Lewensohn, L., et al., *Melanoma Res.* 8 (1998) 389-397
- 35 Kato, H., et al., *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 2655-2661
- Kaufman, R.J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-161
- Kull, F.C. Jr., et al. *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 6561-6566
- LeRoith, D., et al., *Endocrin. Rev.* 16 (1995) 143-163

- Li, S.L., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196 (1993) 92-98
- Li, S.L., et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 49 (2000) 243-252
- Lonberg, N. og Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* 25 (1995) 65-93
- Lonberg, N., et al., *Nature* 368 (1994) 856-859
- 5 Lonberg, N., *Handbook of Experimental Pharmacology* 113 (1994) 49-101
- Love, T.W., et al., *Methods Enzymol.* 178 (1989) 515-527
- Makrides, S.C., *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202
- Morgan, D.O. og Roth, R.A., *Biochemistry* 25 (1986) 1364-1371
- Morrison, S.L., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 6851-6855
- 10 Neuberger, M.S., et al., *Nature* 314 (1985) 268-270
- Norderhaug, L., et al., *J. Immunol. Methods* 204 (1997) 77-87
- O'Brien, R.M., et al., *EMBO J.* 6 (1987) 4003-4010
- Orlandi, R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 3833-3837
- Pessino, A., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162 (1989) 1236-1243
- 15 Pietrzkowski, Z., et al., *Cell Growth Differ* 4 (1992) 199-205
- Prigent, S.A., et al., *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 9970-9977
- Queen, C., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10029-10033
- Riechmann, L., et al., *Nature* 332 (1988) 323-327
- Rohlik, Q.T., et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 149 (1987) 276-281
- 20 Schaefer, E.M., et al., *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 13248-13253
- Schlaeger, E.-J. og Christensen, K., *Cytotechnology* 30 (1999) 71-83
- Schlaeger, E.-J., *J. Immunol. Methods* 194 (1996) 191-199
- Scotlandi, K., et al., *Cancer Gene Ther.* 9 (2002) 296-307
- Scotlandi, K., et al., *Int. J. Cancer* 101 (2002) 11-16
- 25 Sojahl, H.T. og Bahl, O.P., *Arch. Biochem. Biophys.* 259 (1987) 52-57
- Soos, M.A., et al., *Biochem. J.* 235 (1986) 199-208
- Soos, M.A., et al., *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 12955-12963
- Soos, M.A., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 5217-5221
- Stella et al., "Prodrug: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," *Directed Drug*
- 30 *Delivery*, Borchardt et al., (ed.), s 247-267, Humana Press (1985)
- Surinya, K.H., et al., *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 16718-16725
- Taylor, L., et al., *Int. Immunol.* 6 (1994) 579-591 Choi, T.K., et al., *Nature Genetics* 4
- (1993) 117-123
- Taylor, L., et al., *Nucleic Acids Research* 20 (1992) 6287-6295
- 35 Taylor, R., et al., *Biochem. J.* 242 (1987) 123-129
- Thotakura, N.R. og Bahl, O.P., *Meth. Enzymol.* 138 (1987) 350-359
- Tuaille, N., et al., *Immunol.* 152 (1994) 2912-2920
- Tuaille, N., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 3720-3724

- Tulloch, P.A., et al., *J. Struct. Biol.* 125 (1999) 11-18
US-patent nr. 4,179,337
US-patent nr. 4,301,144
US-patent nr. 4,487,603
5 US-patent nr. 4,496,689
US-patent nr. 4,640,835
US-patent nr. 4,670,417
US-patent nr. 4,675,187
US-patent nr. 4,791,192
10 US-patent nr. 5,202,238
US-patent nr. 5,204,244
US-patent nr. 5,545,806
US-patent nr. 5,545,807
US-patent nr. 5,569,825
15 US-patent nr. 5,625,126
US-patent nr. 5,633,425
US-patent nr. 5,661,016
US-patent nr. 5,770,429
US-patent nr. 5,789,650
20 US-patent nr. 5,814,318
US-patent nr. 5,874,299
US-patent nr. 5,877,397
van Dijk, M.A. og van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Pharmacol.* 5 (2001) 368-374
Vitetta, E.S., et al., *Science* 238 (1987) 1098-1104
25 Werner, R.G., *Drug Res.* 48 (1998) 870-880
Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, s.
375-382, 615th Meeting Belfast (1986)
WO 01/14424
WO 02/053596
30 WO 87/05330
WO 92/03918
WO 92/22645
WO 93/1227
WO 94/11026
35 WO 94/25585
WO 98/24884

Sekvenslister

5 <110> F. Hoffmann-La Roche
 <120> Antibodies against insulin-like growth factor I receptor and uses thereof
 10 <130> 21695
 <150> EP 03015526
 <151> 2003-07-10
 15 <160> 8
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 118
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 25 Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 30 Ser Gln Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 35 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 40 Ala Ile Ile Trp Phe Asp Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 45 Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 45 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

46

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

5 Leu Val Ser Val Ser Ser
115

<210> 2
10 <211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
15 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 3
45 <211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
50 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

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

48

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

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

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

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

20 <210> 5
 <211> 990
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

25 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(990)

30 <400> 5
 gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag 48
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

35 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

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

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

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

	tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag	288
	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys	
	85 90 95	
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	

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

5 <400> 7
 cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag 48
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

10 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

15 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

20 tcg ggt aac tca cag gag agc gtc aca gag cag gac agc aag gac agc 192
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

25 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

30 aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg 288
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

30 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

35 <210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 8
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

45 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

50 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

55 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

53

65

70

75

80

5 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

85

90

95

10 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100

105

15

Patentkrav

1. Fremgangsmåte for seleksjonen av et antistoff mot IGF-IR fra en rekke antistoffer mot IGF-IR karakterisert ved at en cellulær fosforyleringsanalyse ved anvendelse av 3T3 celler under forutsetning av 400,000 til 600,000 molekyler IGF-IR pr. celle i et medium
- 5 inneholdende 0,5% varmeinaktivert føtalt kalveserum (FCS) utføres med nevnte antistoffer og nevnte antistoff, som ikke oppviser noen IGF-IR stimulerende aktivitet målt som pkB-fosforylering i en konsentrasjon på 10 μ M sammenlignet med en slik analyse uten nevnte antistoff, selekteres.

Fig.1

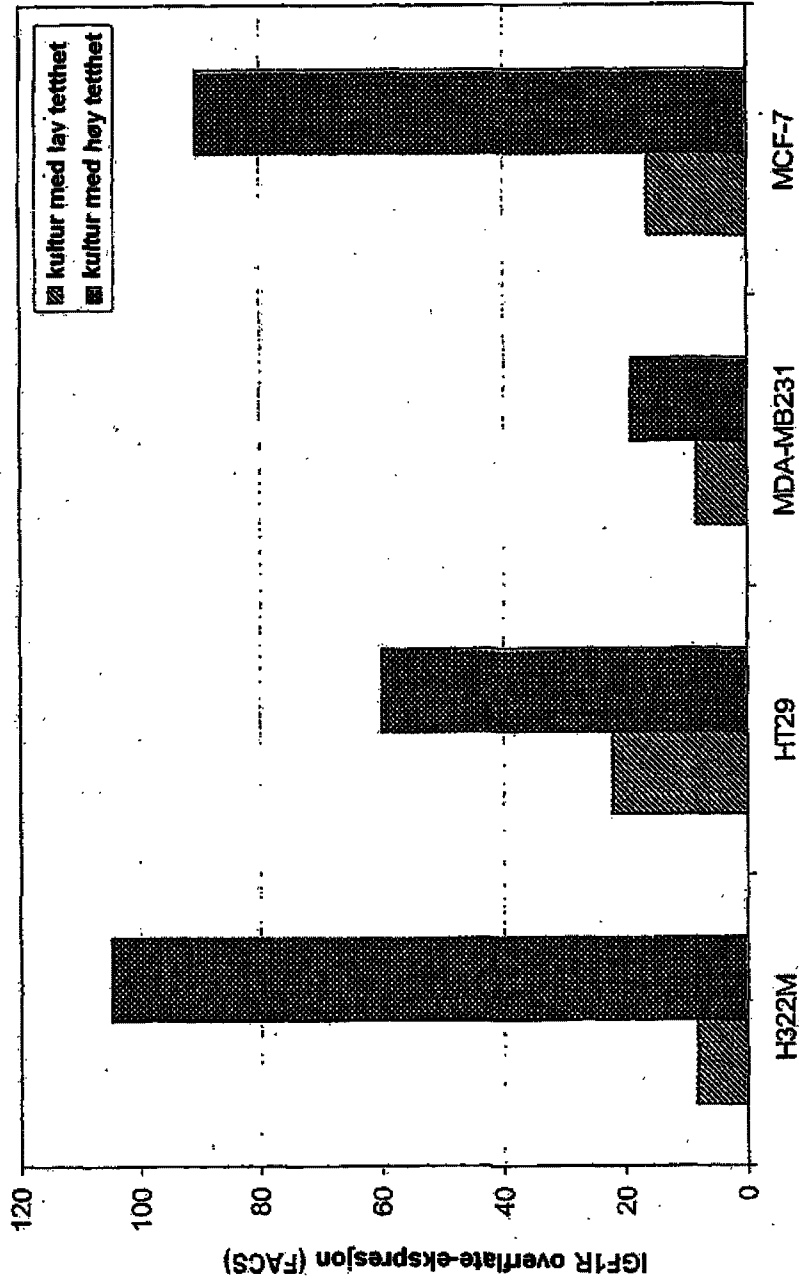


Fig.2

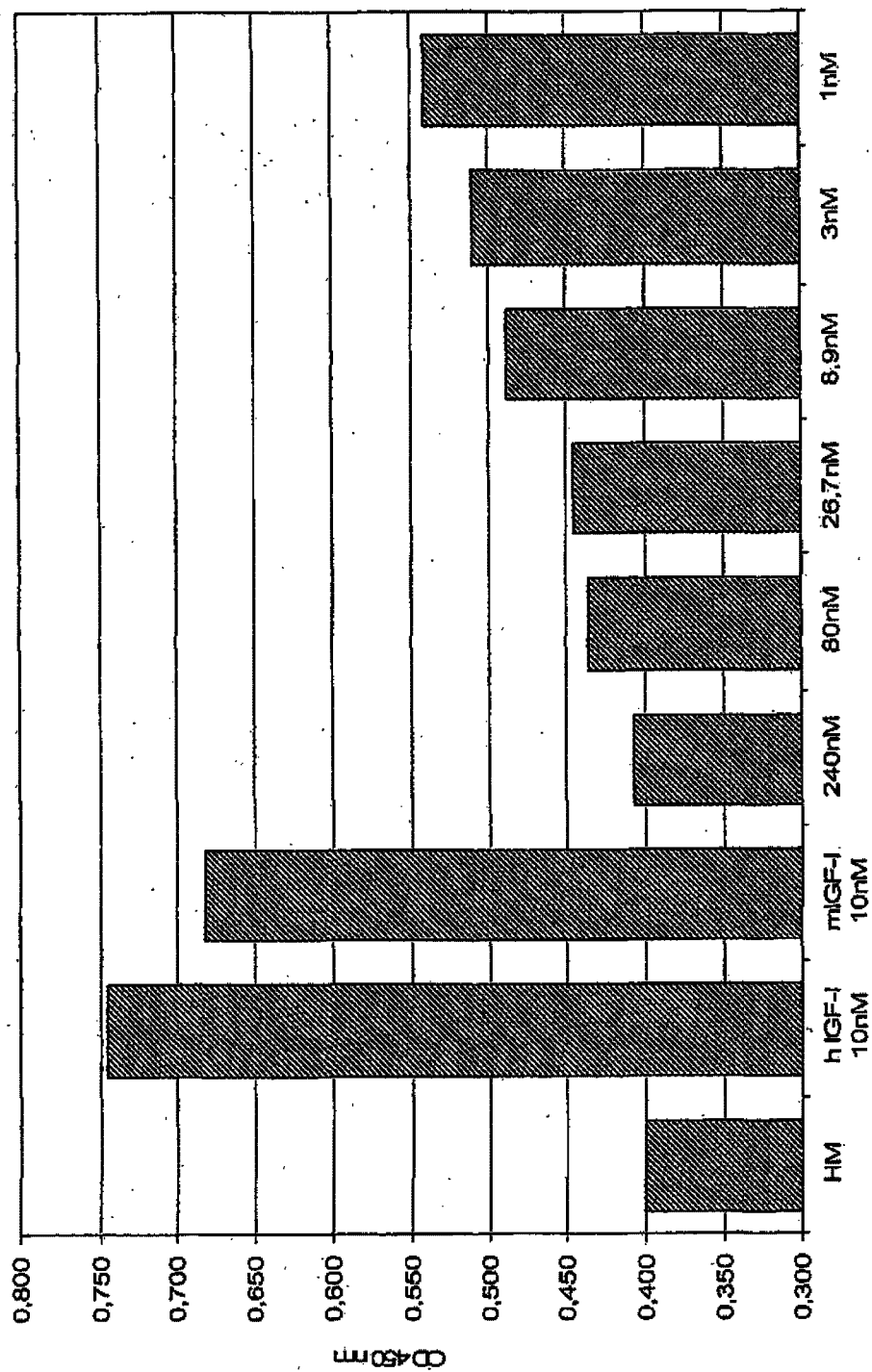


Fig.3

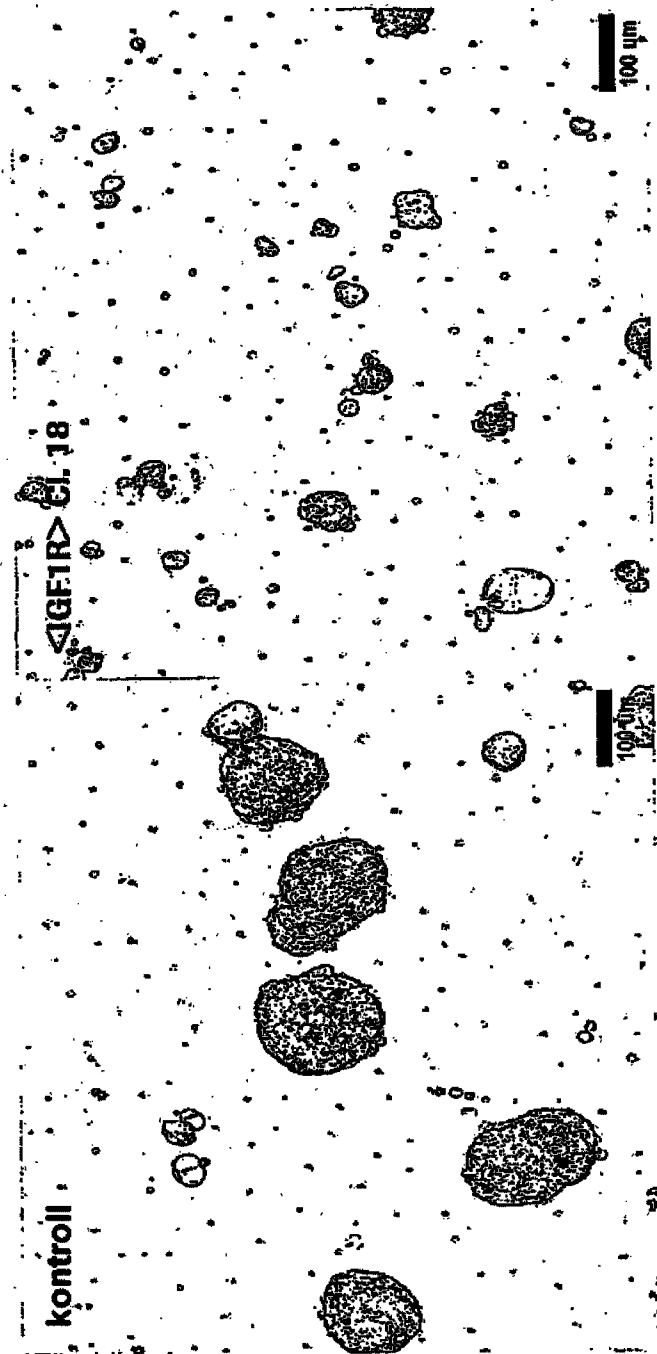


Fig.4

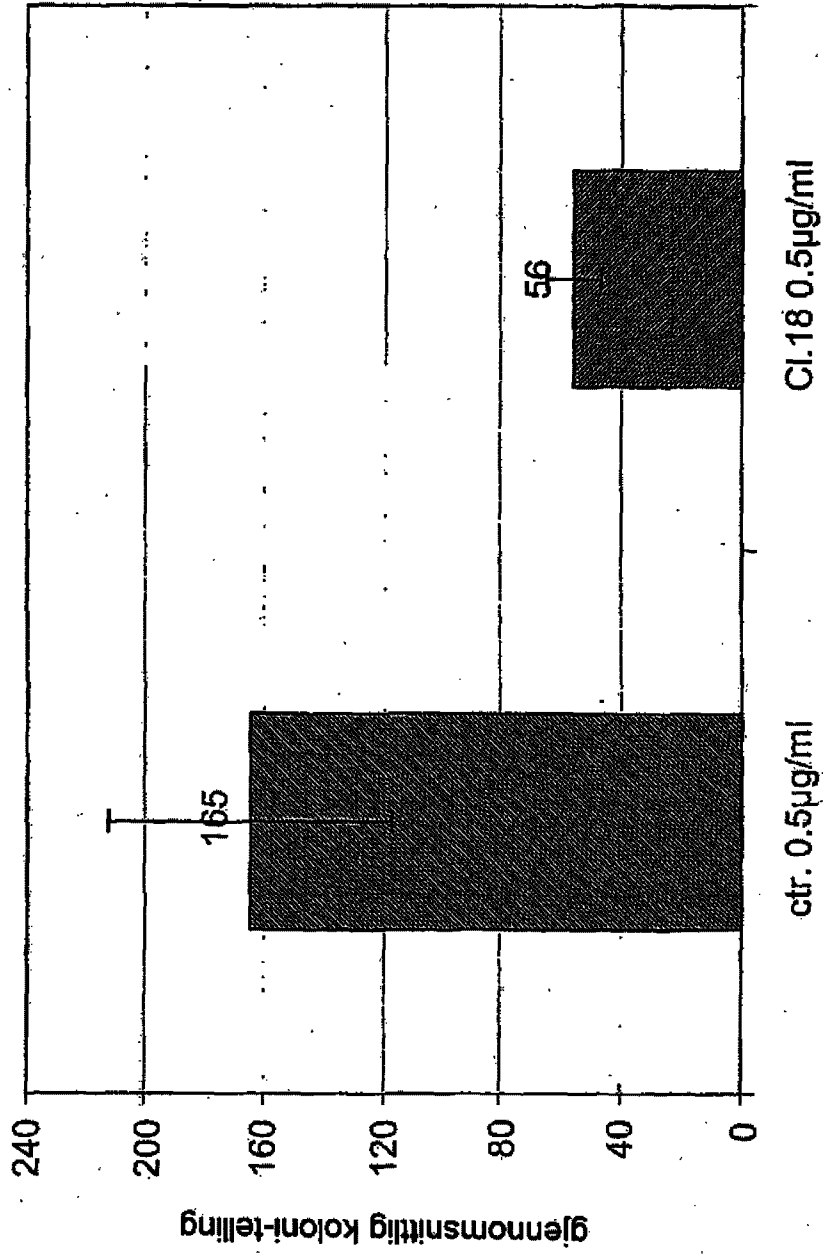


Fig.5

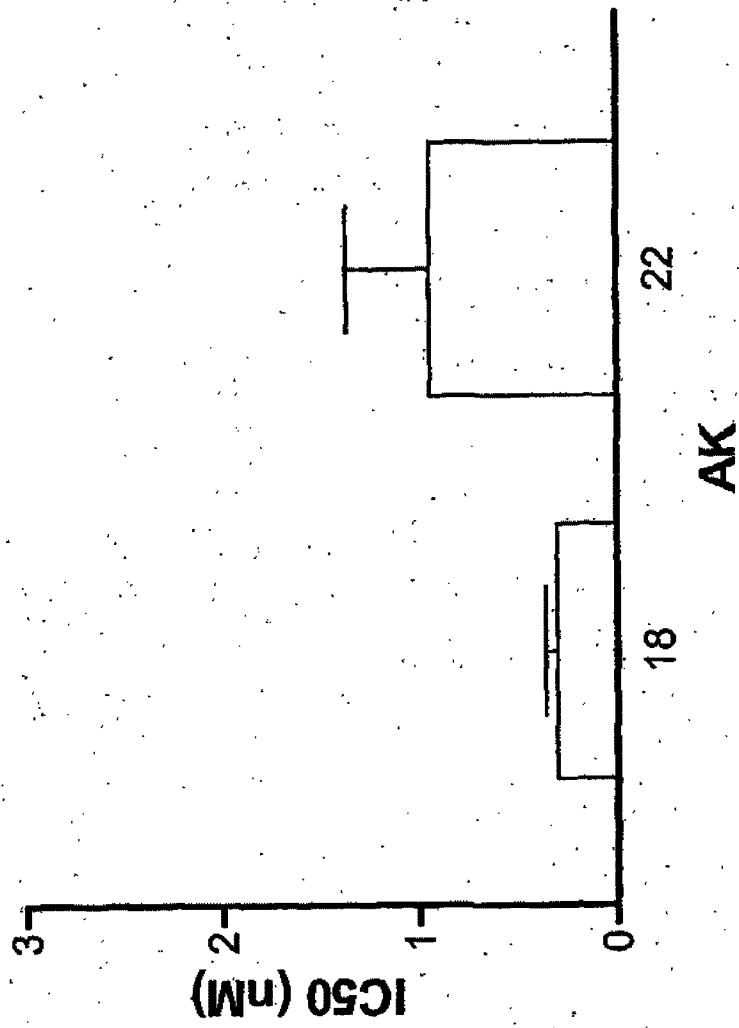


Fig.7

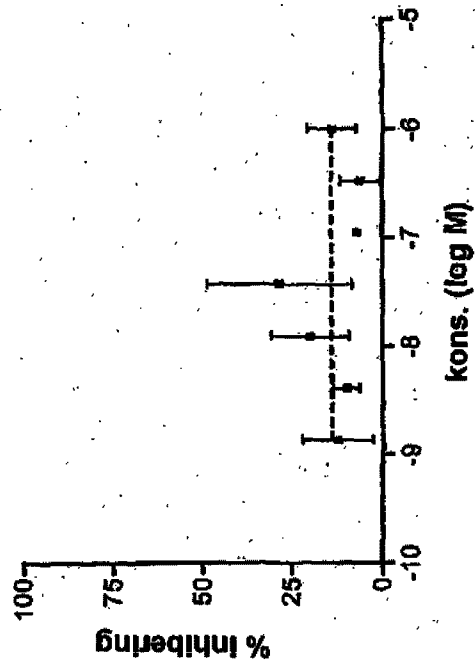


Fig.6

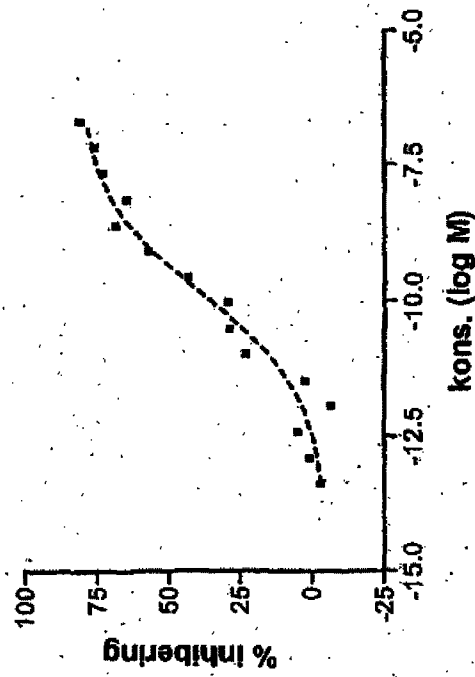


Fig.8

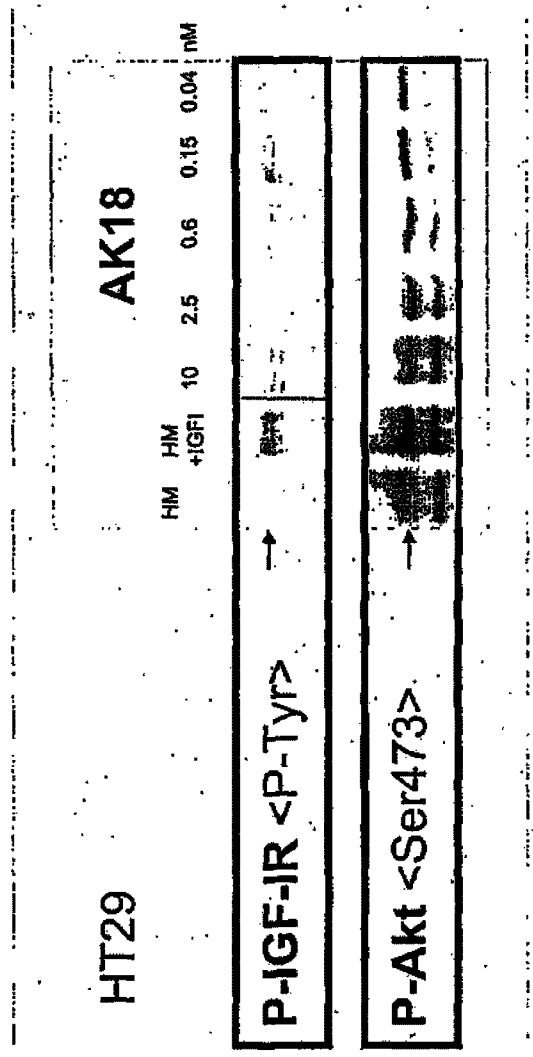


Fig.9

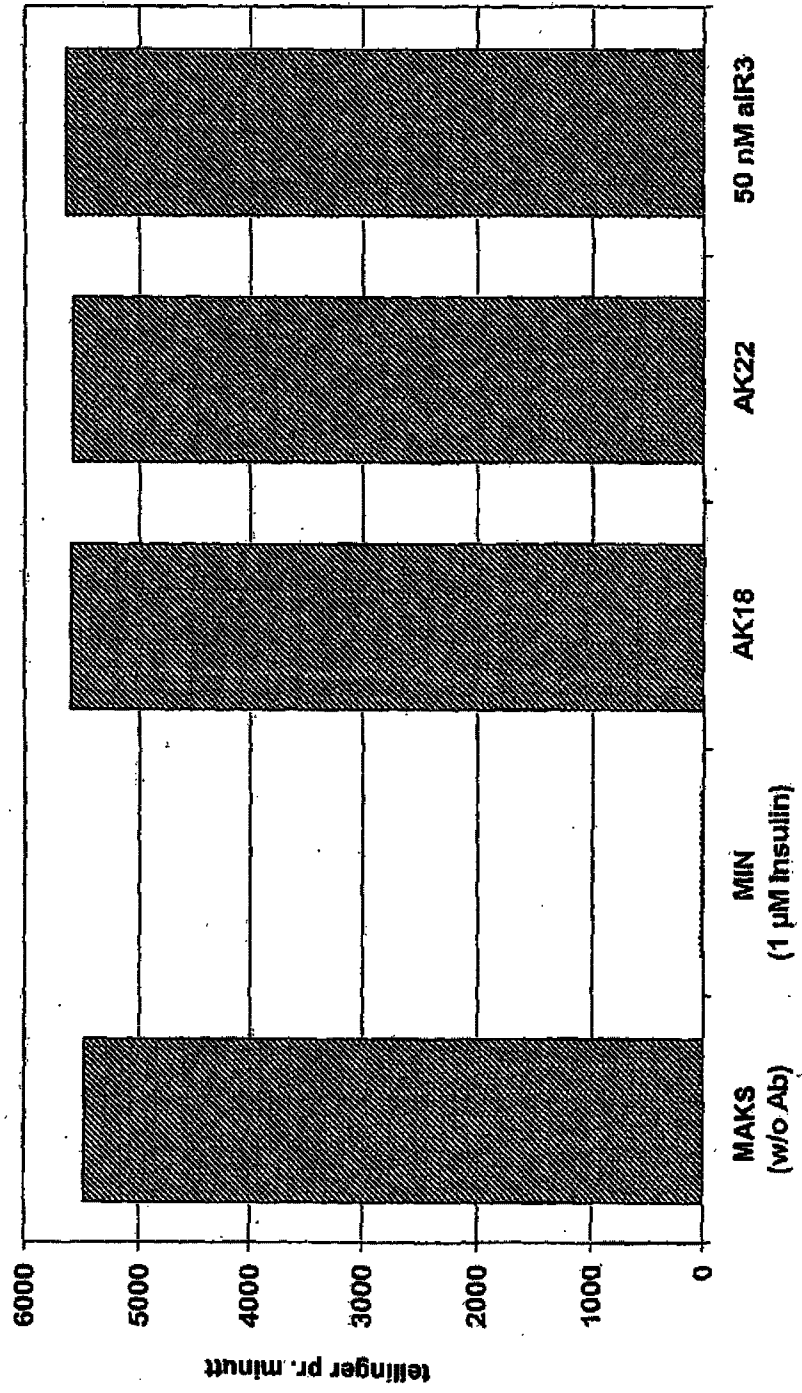


Fig.11

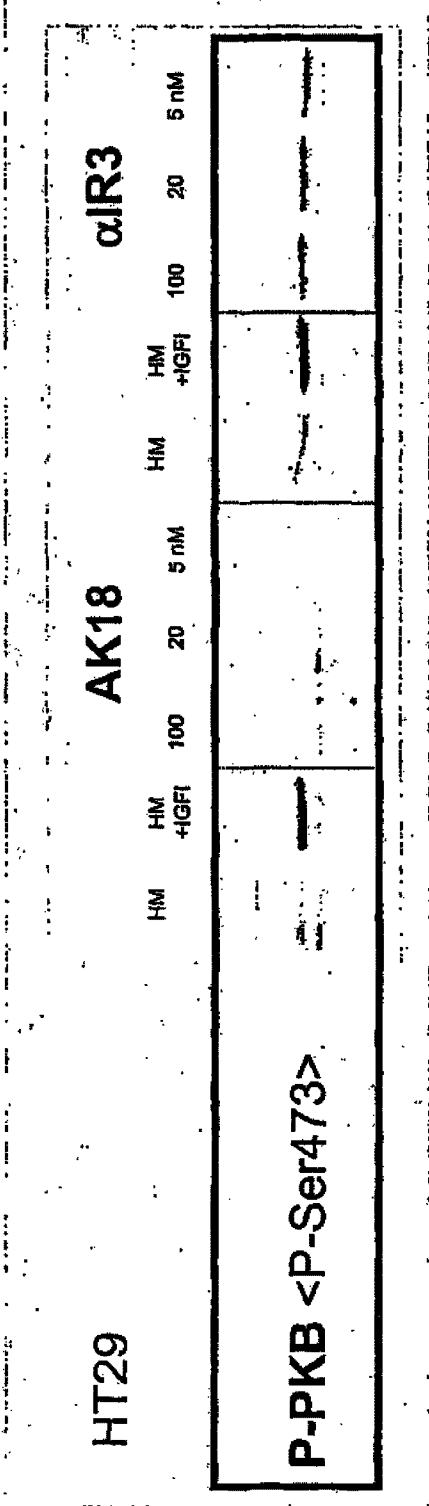


Fig.12

H322M xenograft	vehikkel	10 mg/kg	2.5 mg/kg	0.6 mg/kg	0.15 mg/kg
	IGF-IR				

Fig. 13

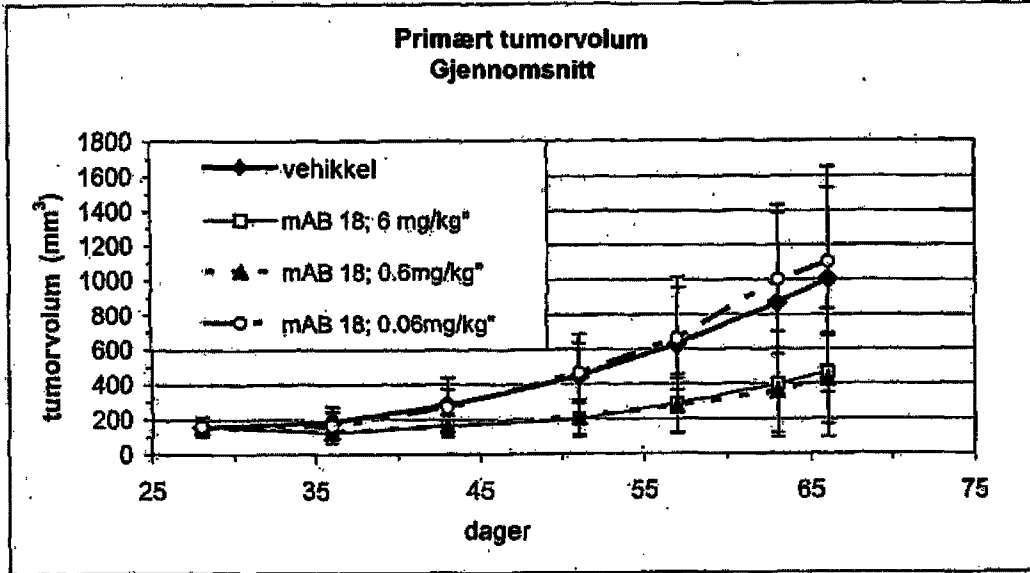


Fig. 14

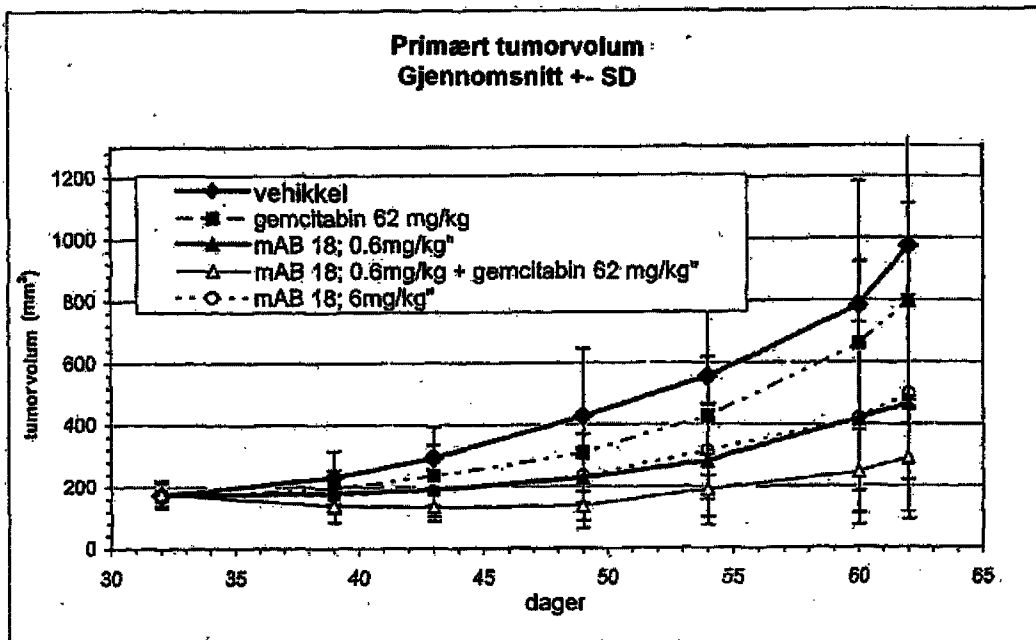


Fig. 15

