



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0710185-6 B1



(22) Data do Depósito: 10/04/2007

(45) Data de Concessão: 14/01/2020

(54) Título: ANTICORPO CONTRA RECEPTOR DE FATOR DE CRESCIMENTO I SEMELHANTE À INSULINA

(51) Int.Cl.: C07K 16/28.

(30) Prioridade Unionista: 11/04/2006 EP 06 007571.0.

(73) Titular(es): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.

(72) Inventor(es): SILKE HANSEN; KLAUS-PETER KUENKELE; DIETMAR REUSCH; RALF SCHUMACHER.

(86) Pedido PCT: PCT EP2007003165 de 10/04/2007

(87) Publicação PCT: WO 2007/115814 de 18/10/2007

(85) Data do Início da Fase Nacional: 10/10/2008

(57) Resumo: ANTICORPOS CONTRA RECEPTOR DE FATOR DE CRESCIMENTO I SEMELHANTE À INSULINA E USOS DOS MESMOS. A presente invenção refere-se a um anticorpo que se liga a IGF-IR, 5 sendo do tipo IgG1 ou IgG3 humana e sendo glicosilado com uma cadeia de açúcar em Asn297, sendo o dito anticorpo caracterizado pelo fato de que a quantidade de fucose dentro da dita cadeia de açúcar é pelo menos 99%, e, além disso, a quantidade de NGNA é 1% ou menos e/ou a quantidade de alfa-1 ,3-gaíactose N-terminal é 1% ou menos, tem propriedades aperfeiçoadas na terapia antitumoral.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**ANTI-CORPO CONTRA RECEPTOR DE FATOR DE CRESCIMENTO I SEMELHANTE À INSULINA**".

[0001] A presente invenção refere-se ao receptor de fator de crescimento I semelhante à insulina (IGF-IR), métodos para sua produção, composições farmacêuticas contendo os ditos anticorpos, e usos dos mesmos.

[0002] Receptor de fator de crescimento I semelhante à insulina (IGF-IR, EC 2.7.112, antígeno CD 221) pertence à família de proteína transmembrânica tirosina cinase (LeRoith, D., et al., *Endocrin. Rev.* 6 (1995) 143-163; e Adams, T. E., *Cell. Mol. Life. Sci.* 57 (2000) 1050-1093). IGF-IR se liga ao IGF-I com alta afinidade e inicia a resposta fisiológica a este ligante *in vivo*. IGF-IR também se liga ao IGF-II, contudo, com afinidade ligeiramente menor. A superexpressão de IGF-IR promove a transformação neoplásica das células e há evidência de IGF-IR estar envolvido na transformação maligna das células e é, portanto, um alvo útil para o desenvolvimento de agentes terapêuticos para o tratamento de câncer (Adams, T.E. et al., *Cell. Mol. Life Sci.* 57 (2000) 1050-1093).

[0003] Anticorpos contra IGF-IR são bem-conhecidos do estado da técnica e investigados quanto aos seus efeitos antitumorais *in vitro* e *in vivo* (Benini, S., et al., *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 1790-1797; Scotlandi, K., et al., *Cancer Gene Ther.* 9 (2002) 296-307; Scotlandi, K., et al., *Int. J. Cancer* 101 (2002) 11-16; Brunetti, A., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165 (1989) 212-218; Prigent, S. A., et al., *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 9970-9977; L1, 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; L1, 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., e 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., e 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; e Kalebic, T., et al., *Cancer Res.* 54 (1994) 5531-5534; Adams, T. E., et al., *Cell. Mol. Life. Sci.* 57 (2000) 1050-1093; 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). Anticorpos contra IGF-IR estão também descritos em muitas outras publicações, por exemplo, Arteaga, C. L., et al., *Breast Cancer Res. Treatment* 22 (1992) 101-106; e Hailey, J., et al., *Mol. Cancer. Ther.* 1 (2002) 1349-1353.

[0004] Em particular, o anticorpo monoclonal contra IGF-IR chamado de α IR3 é largamente usado na investigação que estuda os processos mediados por IGF-IR e doenças mediadas por IGF-I, tal como câncer. Alfa-IR-3 foi descrito por Kull, F.C., *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 6561-6566. Nesse ínterim, cerca de cem publicações foram publicadas relacionadas à investigação e ao uso terapêutico de α IR3 com respeito ao seu efeito antitumoral, sozinho ou junto com agentes citostáticos tais como doxorrubicina e vincristina. α IR3 é um anticorpo monoclonal murino que é conhecido por inibir a ligação de IGF-I ao receptor de IGF, mas não a ligação de IGF-II ao IGF-IR. α IR3 estimula, em altas concentrações, a proliferação de células tumorais e a fosforilação de IGF-IR (Bergmann, U., et al., *Cancer Res.* 55 (1995) 2007-2011; Kato,

H., et al., *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 2655-2661). Existem outros anticorpos (por exemplo, 1H7, Li, S.L., et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 49 (2000) 243-252), que inibem a ligação de IGF-II ao IGF-IR de forma mais potente que a ligação de IGF-I. Um sumário do estado da técnica de anticorpos e suas propriedades e características é descrito por Adams, T.E., et al., *Cell. Mol. Life. Sci.* 57 (2000) 1050-1093.

[0005] A maioria dos anticorpos descritos no estado da técnica é de origem de camundongo. Tais anticorpos, como é bem-conhecido do estado da técnica, não são úteis na terapia de pacientes humanos, sem posteriores alterações, tal como quimerização ou humanização. Com base nessas desvantagens, os anticorpos humanos são claramente preferidos como agentes terapêuticos no tratamento de pacientes humanos. Os anticorpos humanos são bem-conhecidos do estado da técnica (van Dijk, M.A., e van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 368-374). Com base em tal tecnologia, podem ser produzidos anticorpos humanos contra uma grande variedade de alvos. Exemplos de anticorpos humanos contra IGF-IR estão descritos em WO 02/053596, WO 2004071529, WO 2005016967 WO 2006008639, US 20050249730, US 20050084906, WO 2005058967, WO2006013472, US 20030165502, WO 2005082415, WO 2005016970, WO 03106621, WO 04083248, WO 2003100008, WO 2004087756, WO 2005005635 e WO 2005094376.

[0006] Contudo, há ainda uma necessidade por anticorpos contra IGF-IR com benefícios convincentes para pacientes que necessitam de terapia antitumoral. O benefício relevante para o paciente é em termos simples a redução do crescimento do tumor e um significativo prolongamento de tempo para progressão causado pelo tratamento com o agente antitumorigênico.

[0007] Routier, F. H. et al., *Glycoconjugate J.* 14 (1997) 201-207 reportam o padrão de glicosilação de um anticorpo IgG1 humanizado

expresso em células CHO-DUKK. Esse anticorpo mostra uma razão molar de Fuc: Man de 0,8:3,0, que se refere a uma razão de fucosilação de 80%. Niwa, R. et al., *J. Immunol. Methods* 306 (2005) 151-160 reportam anticorpos IgG1 e IgG3 anti-CD20 produzidos recombinantemente em fucosilação de CHO DG44 de 90% resp. 91%. Mimura, Y. et al., *J. Immunol. Methods* 247 (2001) 205-206, reportam que butirato aumenta a produção de IgG quimérica humana em células CHO-K1, enquanto a função e perfil de glicofoma são mantidos. Os perfis de oligossacarídeos mostram um teor considerável de estruturas de glicana afucosilada. Raju, T. S., *BioProcess Internacional* 1 (2003) 44-53 reporta o impacto da variação de glicosilação por sistemas de expressão sobre a atividade biológica das imunoglobulinas terapêuticas e a nomenclatura. Ma, S. et al., *Anal. Chem.* 71 (1999) 5185-5192 reportam a análise de carboidrato de rituximab. Rituximab mostra 9 a 10% de flucosilação (Niwa, R. et al., *J. Immunol. Methods* 306 (2005) 151-160). Fujii, S., *J. Biol. Chem* 265 (1990) 6009-6018 reporta que IgG bovina inclui cerca de 11% de IgG afucosilada. Mizuochi, T., *J. Immunol.* 129 (1982) 2016-2020 reporta que IgG humana é cerca de 14% afucosilada. Bergwerff, A.A., *Glyconjugate J.* 12 (1995) 318-330 reporta que anticorpos produzidos em camundongo SP2/0 contêm oligossacarídeos de ácido N-glicolilneuramínico (NGNA) em grandes quantidades. Nahrgang, S. et al., *Animal Cell Technology: Products from Cells, Cells as Products*, Bernard, A. et al. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, (1999) pp. 259-261, reportam que para expressão em CHO de IgG1, depois da transfecção transitória, foi encontrada uma pobre glicosilação total. Lund, J. et al., *Mol. Immunol.* 30 (1993) 741-748 reportam a produção recombinante de um anticorpo quimérico de camundongo/humano em célula de transfectoma de camundongo. O anticorpo IgG1 é afucosilado em uma quantidade de 13%. Patel, T.P., et al., *Biochem. J.* 285 (1992) 839-845 reportam a glicosilação de

anticorpos a partir de células hibridoma e ascite de camundongo. Niwa R. et al., *J. Immunol. Methods* 306 (2005) 151-160, reportam para anticorpo IgG1 CD20 uma fucosilação de 91% depois da produção recombinante em CHO DG44 e Moril, K. et al., *Biotech. Bioeng.* 88 (2004) 901-908 uma fucosilação de 94%. Davies, J. et al., *Biotechnol. Bioeng.* 74 (2001) 288-294 reportam que a expressão de anticorpos com glicofomas alteradas leva a um aumento de ADCC. Sheeley, D.M., et al., *Anal. Biochem.* 247 (1997) 102-110 comparam a glicosilação de anticorpos em diferentes sistemas de expressão. Shields, R.L., et al., *J. Biol. Chem* 277 (2002) 26733-26740 reportam que falta de fucose em Fc de IgG1 humana aperfeiçoa a ligação de Fc γ RII e ADCC. Um anticorpo Her3 sendo cerca de 90% fucosilado mostra também ADCC em uma quantidade considerável. Zhu, L., et al., *Nature Biotechnol.* 23 (2005) 1159-1169, reportam a produção de anticorpos humanos em ovos de galinha.

Sumário da Invenção

[0008] A invenção compreende um anticorpo que se liga ao IGF-IR, sendo do tipo IgG1 ou IgG3 humana e sendo glicosilado com uma cadeia de açúcar em Asn297, em que o dito anticorpo é caracterizado pelo fato de que a quantidade de fucose dentro da cadeia de açúcar é pelo menos 98% ("completamente fucosilado", versões preferidas vide abaixo), e, além disso, a quantidade de NGNA é 1% ou menos e/ou a quantidade de alfa-1,3-galactose N-terminal é 1% ou menos.

[0009] De acordo com a invenção, "quantidade" significa a quantidade do dito açúcar dentro da cadeia de açúcar em Asn297, em relação à soma de G0, G1, G2 (sem manose (4 e 5)) como 100% e conforme calculada no exemplo 3.

[00010] De acordo com a invenção, é possível proporcionar anticorpos que se ligam ao IGF-IR com uma fucosilação de ainda 99,4% ou mais, 99,5% ou mais ou 99,9% ou mais.

[00011] Preferivelmente, a quantidade de NGNA é de 0,5% ou menos, mais preferivelmente de 0,1% ou menos e ainda não detectável por LCMS (Cromatografia Líquida/Espectrometria de Massa).

[00012] Preferivelmente, a quantidade de alfa-1,3-galactose N-terminal é 0,5% ou menos, mais preferivelmente 0,1% ou menos e ainda não detectável por LCMS.

[00013] A cadeia de açúcar mostra, preferivelmente, as características nas glicanas N-ligadas e ligadas a Asn297 de um anticorpo que se liga ao IGF-IR recombinantemente expresso em uma célula CHO (ovário de hamster chinês).

[00014] Preferivelmente, a célula CHO é uma célula CHO que compreende a deleção (por exemplo, DG44) ou inativação funcional de ambos os alelos DHFR ou uma deleção de um alelo DHFR e uma inativação funcional do segundo alelo DHFR (por exemplo, DXB11).

[00015] Preferivelmente, o anticorpo é um anticorpo monoclonal. Preferivelmente, o anticorpo é um anticorpo quimérico, humanizado ou humano.

[00016] A invenção compreende preferivelmente um anticorpo completamente fucosilado que se liga ao IGF-IR e que inibe a ligação de IGF-I e IGF-II ao IGF-IR, caracterizado pelo fato de que o dito anticorpo mostra uma ou mais propriedades selecionadas do grupo que consiste em:

a) mostra uma razão de valores IC_{50} de inibição da ligação de IGF-I ao IGF-IR para a inibição de ligação de IGF-II ao IGF-IR de 1:3 a 3:1,

b) inibe para pelo menos 80%, preferivelmente 90%, em uma concentração de IGF-IR a 5nM a fosforilação em um ensaio de fosforilação celular usando células HT29, em um meio contendo 0,5% de soro de bezerro fetal (FCS) terminativado em comparação com tal ensaio sem o dito anticorpo,

c) não mostra atividade estimulante de IGF-IR (nenhuma sinalização, nenhuma atividade mimética de IGF-1) medida por fosforilação de PKB em uma concentração de $10\mu\text{M}$ em um ensaio de fosforilação celular usando células 3T3, proporcionando 400.000 a 600.000 moléculas de IGF-IR por células em um meio contendo 0,5% de soro de bezerro fetal (FCS) termoinativado em comparação com tal ensaio sem o dito anticorpo,

d) infra-regula 50% ou mais de IGF-IR expresso em uma célula tumoral (por exemplo, HT29), 24 horas depois da adição do anticorpo à célula.

[00017] Os anticorpos de acordo com a invenção mostram benefícios para pacientes que necessitam de terapia antitumoral e proporcionam a redução de crescimento de tumor e um significativo prolongamento de tempo para progressão. Os anticorpos de acordo com a invenção têm propriedades novas e inventivas que proporcionam um benefício para um paciente que sofre de doença associada a uma desregulação de IGF, especialmente uma doença tumoral. Os anticorpos de acordo com a invenção são caracterizados pelas propriedades mencionadas acima.

[00018] Surpreendentemente, um anticorpo de acordo com a invenção ("anticorpo completamente fucosilado") não causa ADCC (citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo) (dentro de $3\times\text{DP}$ (desvio-padrão) do anticorpo-padrão de referência (anticorpo contra hemocianina de lapa californiana, anticorpo contra KLH)) conforme mostrado no ensaio de ADCC descrito no exemplo.

[00019] Preferivelmente, o anticorpo é de ligação específica para IGF-IR, inibindo a ligação de IGF-I e IGF-II ao IGF-IR na razão mencionada acima, é de isótipo de IgG1, e não é de ativar a sinalização de IGF-IR mesmo nas células que superexpressam IGF-IR em uma concentração de 200 vezes do seu valor de IC_{50} .

[00020] Os anticorpos que se ligam ao IGF-IR, não tendo "atividade mimética de IGF-I" em combinação com "fucosilação completa", proporcionam uma grande vantagem quando usados como um agente terapêutico.

[00021] Preferivelmente, em uma concentração de anticorpos a 5nM de acordo com a invenção inibem completamente a transdução de sinal mediada por IGF-I de IGF-IR em células tumorais.

[00022] Ácidos nucleicos preferidos de polipeptídeos, que são capazes de serem montados juntamente com a outra cadeia de anticorpo respectiva a um anticorpo de acordo com a invenção são definidos abaixo:

a) uma cadeia pesada do anticorpo compreendendo como CDRs a CDR1 (aa 31-35), CDR2 (aa 50-66) e CDR3 (aa 99-107) da SEQ ID NO:1 ou 3;

b) uma cadeia leve do anticorpo compreendendo como CDRs a CDR1 (aa 24-34), CDR2 (aa 50-56) e a CDR3 (aa 89-98) da SEQ ID NO:2 ou 4.

[00023] O anticorpo é preferivelmente um anticorpo monoclonal e, além disso, um anticorpo quimérico (cadeia constante humana), um anticorpo humanizado e de modo especialmente preferível um anticorpo humano.

[00024] O anticorpo se liga preferivelmente ao IGF-IR humano (EC 2.7.1.112, SwissProt P08069) em competição com o anticorpo 18.

[00025] O anticorpo é preferivelmente ainda caracterizado por uma afinidade de 10^{-8} M (K_D) ou menos, preferivelmente de cerca de 10^{-9} e 10^{-13} M.

[00026] O anticorpo não mostra, preferivelmente, inibição dependente de concentração detectável de ligação da insulina ao receptor de insulina.

[00027] O anticorpo é preferivelmente do tipo IgG1.

[00028] O anticorpo, de acordo com a invenção, prolonga de modo considerável o tempo para progressão em modelos de tumores de xenoinxerto relevantes em comparação com animais tratados com veículo e reduz o crescimento do tumor. O anticorpo inibe a ligação de IGF-I e IGF-II ao IGF-IR *in vitro* e *in vivo*, preferivelmente em cerca de uma maneira igual para IGF-I e IGF-II.

[00029] Preferivelmente, os anticorpos de acordo com a invenção compreendem como regiões determinadoras de complementaridade (CDRs) as seguintes seqüências:

a) uma cadeia pesada do anticorpo compreendendo como CDRs a CDR1 (aa 31-35), CDR2 (aa 50-66) e CDR3 (aa 99-107) da SEQ ID NO:1 ou 3;

b) uma cadeia leve de anticorpo compreendendo como CDRs a CDR1 (aa 24-34), CDR2 (aa 50-56) e CDR3 (aa 89-98) da SEQ ID NO:2 ou 4.

[00030] Regiões variáveis e CDRs preferidas, especialmente a CDR3 da cadeia pesada dos anticorpos de acordo com a invenção, são proporcionadas por <IGF-1R> HUMAB Clone 18 (anticorpo 18) e <IGF-IR> HUMAB Clone 22 (anticorpo 22), depositados com Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Alemanha.

Linhagem de Célula	Depósito N°	Data do Depósito
<IGF-IR> HUMAB-Clone 18	DSM ACC 2587	10/04/2003
<IGF-IR> HUMAB-Clone 22	DSM ACC 2594	09/05/2003

[00031] Esses anticorpos estão descritos em detalhes no WO 2005/005635.

[00032] Outras regiões variáveis e CDRs preferidas, especialmente CDR3 da cadeia pesada dos anticorpos de acordo com a invenção são proporcionadas por <IGF-1R> HuMab Clone 1a (anticorpo 1A, Ab 1A, ou Ak 1A), <IGF-1R> HuMab Clone 23 (anticorpo 23) e <IGF-1R> Hu-

Mab-Clone 8 (anticorpo 8), depositado com Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Alemanha:

Linhagem de Célula	Depósito N°	Data do Depósito
<IGF-IR> HUMAB-Clone 1a	DSM ACC 2586	10/04/2003
<IGF-IR> HUMAB-Clone 23	DSM ACC 2588	10/04/2003
<IGF-1R> HUMAB-Clone 8	DSM ACC 2589	24/04/2003

[00033] Esses anticorpos são descritos em detalhes no WO 2004/087756.

[00034] A invenção proporciona ainda métodos para a produção recombinante de tais anticorpos.

[00035] A invenção proporciona ainda métodos para o tratamento de câncer, que compreende administrar a um paciente diagnosticado com câncer (e, portanto, necessitando de uma terapia antitumoral) uma quantidade eficaz de um anticorpo antagonista contra o IGF-IR de acordo com a invenção. O anticorpo pode ser administrado sozinho, em uma composição farmacêutica, ou alternativamente em combinação com um tratamento citotóxico tal como radioterapia ou um agente citotóxico ou um produto deste.

[00036] A invenção compreende ainda o uso de um anticorpo de acordo com a invenção para tratamento de câncer e para a fabricação de uma combinação farmacêutica de acordo com a invenção. Além disso, a invenção compreende um método para a fabricação de uma composição farmacêutica de acordo com a invenção.

[00037] A invenção compreende ainda uma composição farmacêutica contendo um anticorpo de acordo com a invenção em uma quantidade farmacêuticamente eficaz, opcionalmente juntamente com um tampão e/ou um adjuvante útil para a formulação de anticorpos para fins farmacêuticos.

[00038] A invenção proporciona ainda composições farmacêuticas que compreendem tais anticorpos em um veículo farmacêuticamente

aceitável. Em uma modalidade, a composição farmacêutica pode ser incluída em um artigo ou kit.

[00039] A invenção compreende ainda um método para a produção de um anticorpo humano recombinante de acordo com a invenção, caracterizado por expressar um ácido nucléico que codifica um anticorpo que se liga ao IGF-1R em uma célula hospedeira CHO, que fucosila completamente o dito anticorpo e recupera o dito anticorpo da dita célula. A invenção compreende ainda o anticorpo obténível por tal método recombinante.

Breve Descrição do Desenho

[00040] A figura é um quadro de barras mostrando a atividade da ADCC ou falta dela nos anticorpos da invenção e nos anticorpos de controle e comparativos.

Descrição Detalhada da Invenção

[00041] O termo "anticorpo" engloba as várias formas de anticorpos incluindo, mas sem limitação, anticorpos inteiros, fragmentos de anticorpos, anticorpos humanos, anticorpos humanizados e anticorpos geneticamente engenheirados desde que as propriedades características de acordo com a invenção sejam mantidas.

[00042] "Fragmentos de anticorpos" compreendem uma porção do anticorpo de tamanho natural, geralmente pelo menos da porção de ligação de antígeno ou a região variável deste. Exemplos de fragmentos de anticorpos incluem diácorpos, moléculas de anticorpos de cadeia simples, imunotoxinas, e anticorpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticorpos.

[00043] Os termos "anticorpo monoclonal" e "composição de anticorpo monoclonal", como usados aqui, se referem a uma preparação de moléculas de anticorpos de uma composição de aminoácidos simples. Por conseguinte, o termo "anticorpo monoclonal humano" se refere a anticorpos que exibem uma especificidade de ligação simples,

que têm regiões variáveis e constantes derivadas de seqüências de imunoglobulina da linha germinativa humana.

[00044] O termo "anticorpo quimérico" refere-se a um anticorpo monoclonal que compreende uma região variável, isto é, região de ligação, de uma fonte ou espécie e pelo menos uma porção de uma região constante derivada de uma fonte ou espécie diferente, usualmente preparada por técnica de DNA recombinante. Anticorpos quiméricos compreendendo uma região variável murina e uma região constante humana são especialmente preferidos. Tais anticorpos quiméricos murinos/humanos são o produto de genes de imunoglobulina expressos compreendendo segmentos de DNA que codificam regiões variáveis de imunoglobulina murina e segmentos de DNA que codificam regiões constantes de imunoglobulina humana. Outras formas de "anticorpos quiméricos" englobados pela presente invenção são aquelas em que a classe ou subclasse foi modificada ou alterada daquela do anticorpo original. Tais anticorpos "quiméricos" são também referidos como "anticorpos mudados de classe". Os métodos para produzir anticorpos quiméricos envolvem técnicas convencionais de DNA recombinante e de transfecção de gene agora bem-conhecidas da técnica. Vide, por exemplo, Morrison, S.L., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 6851-6855; Patentes US 5.202.238 e US 5.204.244.

[00045] O termo "anticorpo humanizado" se refere aos anticorpos onde a estrutura ou "regiões determinadoras de complementaridade" (CDR) foram modificadas para compreender a CDR de uma imunoglobulina de especificidade diferente em comparação com aquela da imunoglobulina parente. Em uma modalidade preferida, uma CDR murina é enxertada na região de estrutura de um anticorpo humano para preparar o "anticorpo humanizado". Vide, por exemplo, Riechmann, L. et al., *Nature* 332 (1988) 323-327; e Neuberger, M.S., et al., *Nature* 314 (1985) 268-270. CDRs particularmente preferidas correspondem àque-

las que representam seqüências que reconhecem os antígenos mencionados acima para anticorpos quiméricos e bifuncionais.

[00046] O termo "anticorpo humano", como usado aqui, tem o objetivo de incluir anticorpos tendo regiões variáveis e constantes derivadas das seqüências de imunoglobulina de linha germinativa humana. A cadeia pesada variável é preferivelmente derivada da seqüência de linha germinativa DP-50 (GenBank LO6618) e a cadeia leve variável é preferivelmente derivada da seqüência de linha germinativa L6 (GenBank X01668) ou a cadeia pesada variável é preferivelmente derivada de DP-61 (GenBank M99682) e a cadeia leve variável é derivada da seqüência de linha germinativa L15 (GenBank K01323). As regiões constantes do anticorpo são regiões constantes do tipo IgG1 humana. Tais regiões podem ser alotípicas e são descritas, por exemplo, por Johnson, G., e Wu, T.T., *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 214-218 e as bases de dados referenciadas aí.

[00047] O termo "anticorpo humano recombinante" se refere a anticorpos tendo regiões variáveis e constantes derivadas de seqüências de imunoglobulina da linha germinativa humana em uma forma rearranjada. Os anticorpos humanos recombinantes, de acordo com a invenção, têm sido submetidos a uma hipermutação somática *in vivo*. Assim, as seqüências de aminoácidos das regiões VH e VL dos anticorpos recombinantes são seqüências que, embora derivadas de e relacionadas às seqüências de VH e VL da linha germinativa humana, não podem existir naturalmente dentro do repertório da linha germinativa do anticorpo humano *in vivo*.

[00048] Como usado aqui, "ligação" refere-se à ligação do anticorpo ao IGF-IR com uma afinidade de cerca de 10^{-13} e 10^{-8} M (K_D), preferivelmente de cerca de 10^{-13} a 10^{-9} M.

[00049] O termo "molécula de ácido nucléico", como usado aqui, tem o objetivo de incluir moléculas de DNA e moléculas de RNA. Uma

molécula de ácido nucléico pode ser de filamento simples ou de filamento duplo, mas é preferivelmente DNA de filamento duplo.

[00050] Domínios constantes humanos tendo do tipo IgG1 ou IgG3 são descritos em detalhes por Kabat, E.A. et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Edição, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), e por Brüggemann, M., et al., *J. Exp. Med.* 166 (1987) 1351-1361; Love, T.W., et al., *Methods Enzymol.* 178 (1989) 515-527. Exemplos são mostrados nas SEQ ID NOS:5 a 8. Outros domínios constantes úteis e preferidos são os domínios constantes dos anticorpos obteníveis das linhagens de células híbridoma depositadas com DSMZ para esta invenção.

[00051] Os domínios constantes do tipo IgG1 ou IgG3 são glicosilados em Asn297. "Asn297", de acordo com a invenção, significa o aminoácido asparagina localizado em cerca da posição 297 na região de Fc; com base nas variações de seqüência menores dos anticorpos, Asn297 pode ser também localizada em alguns aminoácidos menores (usualmente não mais que ± 3 aminoácidos) a montante ou a jusante. Por exemplo, em um anticorpo de acordo com a invenção, "Asn297" está localizada na posição de aminoácido 298.

[00052] A glicosilação da IgG1 ou IgG3 humana ocorre em Asn297 como glicosilação de oligossacarídeo complexo diantênario fucosilado de núcleo terminada com até 2 resíduos Gal (galactose). Essas estruturas são designadas como G0, G1 ($\alpha 1,6$ ou $\alpha 1,3$) ou resíduos de glicana G2, dependendo da quantidade de resíduos Gal terminal (Raju, T.S., *BioProcess Int.* 1 (2003) 44-53). Glicosilação tipo CHO da partes de Fc de anticorpo é descrita, por exemplo, por Routier, F.H., *Glyconjugate J.* 14 (1997) 201-207.

[00053] A "região variável" (região variável de uma cadeia leve (VL), região variável de uma cadeia pesada (VH)), como usada aqui, denota cada um do par de cadeias leve e pesada envolvido diretamente na

ligação do anticorpo ao antígeno. Os domínios das cadeias, leve e pesada, variáveis, humanas têm a mesma estrutura geral e cada domínio compreende quatro regiões de estrutura (FR), cujas seqüências são largamente conservadas, conectadas por três "regiões hipervariáveis" (ou regiões determinadoras de complementaridade, CDRs). As regiões de estrutura adotam uma conformação da folha β e as CDRs podem formar circuitos que se conectam com a estrutura da folha β . As CDRs em cada cadeia são mantidas em sua estrutura tridimensional pelas regiões de estrutura e formam juntamente com as CDRs da outra cadeia o sítio de ligação de antígeno. As regiões de CDR3 da cadeia pesada e leve do anticorpo desempenham um papel particularmente importante na especificidade/afinidade de ligação dos anticorpos de acordo com a invenção e, portanto, proporcionam um outro objeto da invenção.

[00054] Os termos "região hipervariável" e "porção de ligação de antígeno de um anticorpo", quando usados aqui, referem-se aos resíduos de aminoácidos de um anticorpo que são responsáveis pela ligação ao antígeno. A região hipervariável compreende resíduos de aminoácidos das "regiões determinadoras de complementaridade" ou "CDRs". As regiões de "estrutura" ou de "FR" são aquelas regiões de domínios variáveis diferentes dos resíduos de região hipervariável como aqui definidas. Portanto, as cadeias leve e pesada de um anticorpo compreendem a partir da terminação N a C os domínios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 e FR4. Especialmente, CDR3 da cadeia pesada é a região que contribui mais para a ligação de antígeno. As regiões de CDR e FR são determinadas de acordo com a definição-padrão de Kabat, E.A. et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Edição, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) e/ou aqueles resíduos de um "circuito hipervariável".

[00055] O termo "ligação ao IGF-IR", como usado aqui, significa a ligação do anticorpo ao IGF-IR em um ensaio *in vitro*, preferivelmente em um ensaio de ligação, onde o anticorpo é ligado a uma superfície e a ligação de IGF-IR é medida por Ressonância de Plasmônio de Superfície (SPR). Ligação significa uma afinidade de ligação (K_D) de 10^{-8} M ou menos, preferivelmente 10^{-13} a 10^{-9} M.

[00056] A ligação ao IGF-IR pode ser investigada por um ensaio Biacore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suécia). A afinidade da ligação é definida pelos termos da constante k_a (constante de taxa para a associação do anticorpo do complexo de anticorpo/antígeno), k_d (constante de dissociação), e K_D (k_d/k_a). Os anticorpos de acordo com a invenção mostram uma K_D de 10^{-10} M ou menos.

[00057] A ligação de IGF-I e IGF-II ao IGF-IR é também inibida pelos anticorpos de acordo com a invenção. A inibição é medida como IC_{50} em um ensaio para a ligação de IGF-I/IGF-II ao IGF-IR em células tumorais. Tal ensaio é descrito no Exemplo 7. Em tal ensaio, a quantidade de IGF-I ou IGF-II radiorrotulado ou de fragmentos de ligação de IGF-IR destes ligados ao IGF-IR proporcionados na superfície das ditas células tumorais (por exemplo, HT29) é medida sem e com concentrações crescentes do anticorpo. Os valores de IC_{50} dos anticorpos de acordo com a invenção para a ligação de IGF-I e IGF-II ao IGF-IR são não mais que 2nM e a razão dos valores IC_{50} para ligação de IGF-I/IGF-II ao IGF-IR é de cerca de 1:3 a 3:1. Os valores IC_{50} são medidos como a média ou valores médios de pelo menos três medições independentes. Valores IC_{50} simples podem estar fora do escopo.

[00058] O termo "inibir a ligação de IGF-I e IGF-II ao IGF-IR", como usado aqui, refere-se a inibir a ligação de IGF-I ou IGF-II rotulado com I^{125} ao IGF-IR apresentado na superfície das células tumorais HT29 (ATCC HTB-38) em um ensaio *in vitro*. Inibir significa um valor IC_{50} de 2nM ou inferior.

[00059] O termo "células que expressam IGF-IR" refere-se a tais células que superexpressam o receptor de IGF-I para cerca de pelo menos 20.000 receptores/célula. Tais células são, por exemplo, linhagens de células tumorais tal como NCI H322M ou HT29, ou uma linhagem de célula (por exemplo, 3T3 ATCC CRL1658) que superexpressa IGF-IR após transfecção com um vetor de expressão para IGF-IR. A quantidade de receptores por célula é medida de acordo com Lamers, R. et al., *EMBO J.* 8 (1989) 1369-1375.

[00060] O termo "inibir a fosforilação de IGF-IR" refere-se a um ensaio de fosforilação celular usando células 3T3 proporcionando 400.000 a 600.000 moléculas de IGF-IR por célula, em um meio contendo 0,5% de soro de bezerro fetal (FCS) terminativo em comparação com tal ensaio sem o dito anticorpo. A fosforilação é detectada por Western blotting usando um anticorpo específico para proteínas fosforiladas em tirosina. Tal ensaio está descrito no Exemplo 11. A terminativação do FCS é realizada por aquecimento em curto tempo para 56°C para inativação do sistema de complemento.

[00061] O termo "inibição da fosforilação por PKB" refere-se a um ensaio de fosforilação celular células 3T3 proporcionando 400.000 a 600.000 moléculas de IGF-IR por célula em um meio contendo 0,5% de soro de bezerro fetal (FCS) terminativo quando em comparação com tal ensaio sem o dito anticorpo. A fosforilação é detectada por Western blotting usando um anticorpo específico para PKB fosforilada na serina 473 da PKB (Akt 1, Prot. Acesso Suíço N° P31749). Tal ensaio está descrito no Exemplo 11.

[00062] O termo "citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC)" refere-se à lise de células-alvo tumorais humanas por um anticorpo de acordo com a presente invenção em presença de células efetoras. ADCC é medida preferivelmente pelo tratamento de uma preparação de células que expressam IGF-IR com um anticorpo de

acordo com a invenção em presença de células efectoras tais como PBMC recentemente isoladas (células mononucleares de sangue periférico) ou células efectoras purificadas de revestimentos de creme leucocitário, como monócitos ou células NK (células exterminadoras naturais).

[00063] O termo "inibição completa da transdução de sinal mediada por IGF-I" refere-se à inibição da fosforilação mediada por IGF-I do IGF-IR. Para tal ensaio, células que expressam IGF-IR, preferivelmente células H322M, são estimuladas com IGF-I e tratadas com um anticorpo de acordo com a invenção (uma concentração de anticorpo de 5nM ou maior é útil). Subseqüentemente, uma SDS PAGE é realizada e fosforilação do IGF-IR é medida por análise de Western blotting com um anticorpo específico para tirosina fosforilada. Inibição completa da transdução de sinal é encontrada se no Western blot nenhuma banda pode ser visivelmente encontrada, que se refere ao IGF-IR fosforilado.

[00064] Os anticorpos da invenção mostram preferivelmente uma ligação ao mesmo epítopo do IGF-IR como anticorpo 18 ou são inibidos na ligação ao IGF-IR devido ao impedimento estérico de ligação pelo anticorpo 18. A inibição de ligação pode ser detectada por um ensaio SPR usando o anticorpo 18 imobilizado e IGF-IR em uma concentração de 20-50nM e o anticorpo a ser detectado em uma concentração de 100nM. Uma redução de sinal de 50% ou mais mostra que o anticorpo compete com o anticorpo 18. Tal ensaio pode ser realizado de mesmo modo usando o anticorpo 22 como um anticorpo imobilizado.

[00065] O termo "epítopo" significa um determinante de proteína capaz de ligação específica a um anticorpo. Epítopos consistem usualmente em grupamentos de moléculas de superfície quimicamente ativa tais como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcar e têm usualmente características estruturais tridimensionais específicas, bem

como características de carga específicas.

[00066] Epítomos conformacionais e não-conformacionais são distinguidos em que a ligação aos anteriores e não aos últimos é perdida em presença de solventes desnaturantes.

[00067] Os anticorpos de acordo com a invenção inibem a fosforilação de IGF-IR da tirosina e preferivelmente também a fosforilação com PKB da tirosina em uma extensão similar.

[00068] Os anticorpos de acordo com a invenção infra-regulam preferivelmente o nível de proteína IGF-IR em células tumorais e em tumores, por exemplo, tumores em xenoenxerto.

[00069] Os anticorpos de acordo com a invenção inibem preferivelmente o crescimento tridimensional das células tumorais em ensaio de formação de colônias bem como a proliferação de células que expressam IGF-IR (por exemplo, células NIH 3T3).

[00070] Os anticorpos de acordo com a invenção não inibem, preferivelmente, a ligação de insulina ao receptor de insulina em um ensaio de competição de ligação em células 3T3 que superexpressam receptor de insulina, usando o anticorpo em uma concentração de 200 nmols/L.

[00071] Os anticorpos de acordo com a invenção são produzidos por meios recombinantes em uma célula CHO que fucosila completamente o anticorpo. Para a expressão de proteína, os ácidos nucleicos codificam as cadeias leves e pesadas, ou fragmentos destes são inseridos nos vetores de expressão por métodos-padrão. A expressão é realizada em tais células CHO, e o anticorpo é recuperado das células (sobrenadante ou células após a lise).

[00072] Uma célula hospedeira CHO útil pode ser produzida por um método que compreende cultivar uma célula CHO, transfectada com ácido nucleico que codifica um anticorpo de acordo com a invenção, sob pressão de seleção DHFR, colher clones simples expandindo os

clones e selecionar um clone que produza um anticorpo com padrão de glicosilação de acordo com a invenção. Preferivelmente, a cultura é realizada por pelo menos dois, preferivelmente pelo menos três semanas. A célula CHO é preferivelmente uma célula DG44.

[00073] O termo "célula CHO" engloba as várias formas de células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) com base em dois alelos dhfr (deficientes em diidrofolato redutase (dhfr)), funcionalmente inativos, preferivelmente deletados. Tais células dhfr e métodos para sua geração são descritos, por exemplo, por Urlaub, G. et al., *Cell* 33 (1983) 405-412; Chasin, L. et al., *Som. Cell Molec. Genet.* 12 (1986) 555-556; Kolkekar, A.S. et al., *Biochemistry* 36 (1997) 10901-10909. Preferivelmente, a célula é uma linhagem de célula DG44. Tais células CHO dhfr podem ser produzidas usando raios gama para eliminar o local dhfr inteiro. Em células do tipo selvagem não-mutadas, dhfr é uma enzima essencial para a síntese de novo de glicina, purinas, e timidilato. Isso permite que o gene de dhfr codificado em plasmídeos seja usado como um marcador selecionável dominante e um amplificador de gene para a expressão de proteínas em linhagens de células deficientes de dhfr. A mutação de dhfr em célula DG44 é estável e irreversível. As células CHO co-transfectadas com sucesso com vetor(es) de expressão para um anticorpo do tipo de IgG1 ou IgG3 humana e o gene de DHFR possuirão o fenótipo dhfr+ e podem ser prontamente selecionados por cultura das colônias em meios isentos de timidina e hipoxantina e contendo, opcionalmente, metotrexato (MTX) para ampliação.

[00074] Células DG44 são bem-conhecidas do estado da técnica e, por exemplo, comercialmente disponíveis como linhagens de células, por exemplo, da Invitrogen Corp. (E.U.A). As células DG44 podem crescer aderentes, em suspensão e/ou em meio isento de soro. Como usadas aqui as expressões "célula", "linhagem de células" e "cultura de células" são empregadas intercambiavelmente e todas tais designações de

linhagens de células CHO dhfr⁻ (dois alelos dhfr deletados) incluem progênie. Assim, as palavras "transformantes" e "células transformadas" incluem a célula primária do paciente e as culturas derivadas dela sem consideração ao número de transferências. É também entendido que toda a progênie não pode ser precisamente idêntica ao teor de DNA, devido às mutações deliberadas ou negligentes. É incluída a progênie variante que tem as propriedades de glicosilação de acordo com a invenção conforme selecionadas na célula originalmente transformada.

[00075] Preferivelmente, a linhagem de células CHO dhfr⁻ é co-ampliada com pelo menos DHFR como um gene marcador selecionável. Por exemplo, um vetor de expressão de mamífero contendo o(s) marcador(es) selecionável(veis) e o gene de anticorpo são co-transfectados em células CHO recipientes. As colônias resultantes podem ser selecionadas e colônias exibindo o fenótipo esperados são capazes de expressarem o anticorpo. Marcadores selecionáveis adicionais podem ser ou não de natureza dominante. Exemplos de marcadores selecionáveis adicionais para uso na co-transfecção incluem adenosina desaminase (Kaufman, R. J., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986) 3136-3140), asparagina sintetase (Cartier, M., et al., *Mol. Cell Biol.* 7 (1987) 1623-1628), gene de *E. coli* trpB e gene de *Salmonella* hisD (Hartman, S. C., e Mulligan, R. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 8047-8051), ribonucleotídeo redutase de camundongo M2 (Thelander, M., e Thelander, L., *EMBO J.* 8 (1989) 2475-2479), gene de resistência a multi-fármacos, humano (Kane, S. E., et al., *Gene* 84 (1989) 439-446), glutamina sintetase (Bebbington, C. R. et al., *DNA Cloning*, Vol. 111, D. M. Glover (ed.), IRL Press, pp. 163-188, 1987), xantina guanina fosforibosil transferase (gpt) (Mulligan, R. C., e Berg, P., *Science* 209 (1980) 1422-1427), higromicina B (Santerre, R. F., et al., *Gene* 30 (1984) 147-156), gene de neomicina (Southern, P.

J., e Berg, P., *J. Mol. Appl. Genet.* 1 (1982) 327-341).

[00076] Os marcadores selecionáveis podem proporcionar também a base na qual os genes que codificam o anticorpo podem ser ampliados. Na co-transfecção de uma linhagem de células CHO, os DNAs do vetor são freqüentemente integrado ao cromossomo da célula no mesmo local. Assim, o uso de somente um dos marcadores selecionáveis, como a base para, ampliação resulta normalmente em um aumento paralelo do número de cópias de ambos os genes. Um marcador selecionável particular para uso desse modo é dhfr que permite a ampliação desejada a ser obtida através do uso de concentrações crescentes de MTX (metotrexato). Um segundo marcador selecionável preferido é GS que permite a ampliação pela adição de metionina sulfoximina (MSX).

[00077] Naturalmente, os marcadores selecionáveis estão sob controle de elementos reguladores de DNA de modo a proporcionarem sua expressão. No caso do uso de dhfr como um marcador selecionável, os elementos reguladores são, preferivelmente, de fonte viral tal como de vírus de tumor DNA. Particularmente preferido é o uso de um SV40 ou promotor tardio principal de adenovírus. É particularmente vantajoso, a esse respeito, remover o elemento intensificador do promotor, assim "danificando" o mesmo eficazmente. Essa modificação possibilita níveis aumentados de ampliação de gene em cada concentração de seleção de metotrexato que do contrário ocorreria se um promotor forte fosse usado. No caso do uso de neomicina como um marcador selecionável, um exemplo de um promotor adequado é o promotor de metalotioneína de camundongo.

[00078] Os métodos gerais para produção recombinante de anticorpos são bem-conhecidos do estado da técnica e estão descritos, por exemplo, nos artigos de revisão de Makrides, S. C., *Protein Expr. Purif.* 17 (1999) 183-202; Geisse, S., et al., *Protein Expr. Purif.* 8 (1996) 271-

282; Kaufman, R. J., *Mol. Biotechnol.* 16 (2000) 151-161; Werner, R. G., *Drug Res.* 48 (1998) 870-880.

[00079] Os anticorpos podem estar presentes nas células inteiras, no sobrenadante, em um lisado de células, ou em uma forma parcialmente purificada ou substancialmente pura. A purificação é realizada de modo a eliminar outros componentes celulares ou outros contaminantes, por exemplo, outros ácidos nucléicos ou proteínas celulares, por técnicas-padrão, incluindo tratamento alcalino/SDS, padrão de bandas em CsCl, cromatografia em coluna, eletroforese em gel de agarose, e outras bem-conhecidos da técnica. Vide Ausubel, F., et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing e Wiley Interscience, Nova Iorque (1987).

[00080] As seqüências de controle que são adequadas para procariontes, por exemplo, incluem um promotor, uma seqüência operadora, e um sítio de ligação de ribossomo.

[00081] Células eucarióticas são conhecidas por utilizarem promotores, intensificadores e sinais de poliadenilação.

[00082] O ácido nucléico está "operavelmente ligado" quando é colocado em uma relação funcional com uma outra seqüência de ácidos nucléicos. Por exemplo, DNA para uma pré-seqüência ou líder secretor é operavelmente ligado ao DNA para um polipeptídeo se ele é expresso como uma pré-proteína que participa da secreção do polipeptídeo; um promotor ou intensificador é operavelmente ligado a uma seqüência de codificação se ele afeta a transcrição da seqüência; ou um sítio de ligação de ribossomo é operavelmente ligado a uma seqüência de codificação se ele está posicionado de modo a facilitar a tradução. Geralmente, "operavelmente ligado" significa que as seqüências de DNA que estão sendo ligadas são contíguas, e, no caso de um líder secretor, contíguas e em quadro de leitura. Contudo, intensificadores não têm que ser contíguos. A ligação é obtida por ligação em sítios de

restrição convenientes. Se tais sítios não existem, os adaptadores ou ligantes de oligonucleotídeos sintéticos são usados de acordo com a prática convencional.

[00083] Os anticorpos monoclonais podem ser adequadamente separados de um meio de cultura de hibridoma por procedimentos de purificação de imunoglobulina convencionais, tais como, por exemplo, cromatografia em proteína A-Sepharose, hidroxapatida, eletroforese em gel, diálise, ou cromatografia de afinidade. DNA e RNA que codificam os anticorpos monoclonais são prontamente isolados e seqüenciados usando procedimentos convencionais. As células hibridoma podem servir como uma fonte de tais DNA e RNA. Uma vez identificado e isolado, o DNA pode ser inserido nos vetores de expressão, que são então transfectados nas células CHO que de outro modo não produzem a proteína imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos monoclonais nas células hospedeiras.

[00084] A invenção também pertence a imunoconjugados que compreendem o anticorpo de acordo com a invenção conjugado a um agente citotóxico tal como um agente quimioterapêutico, toxina (por exemplo, toxina enzimaticamente ativa de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou fragmentos desta), isótopo radiativo (isto é, um radioconjugado) ou um pró-fármaco de um agente citotóxico. Agentes úteis na geração de tais imunoconjugados foram descritos acima. Toxinas enzimaticamente ativas e fragmentos destas, que podem ser usadas, incluem cadeia de difteria A, fragmentos ativos de não-ligação da toxina de difteria, cadeia de exotoxina A (da *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia de ricina A, cadeia de abrina A, cadeia de modeccina A, alfa-sarcina, proteínas Aleuritesfordii, proteína diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, e PAP-S), inibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina e os tricotecenos.

[00085] Conjugados do anticorpo e agente citotóxico são feitos usando uma variedade de agentes de acoplamento de proteína bifuncionais tais como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionais de imidoésteres; (tal como adimidato de dimetila HCl), ésteres ativos (tal como suberato de dissuccinimidila), aldeídos (tal como glutaraldeído), compostos de bisazido (tal como (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bisdiazônio (tal como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato de tolueno), e compostos de flúor bisativos (tal como 1,5-diflúor-2,4-dinitrobenzeno). Por exemplo, uma imunotoxina de ricina pode ser preparada conforme descrito por Vitetta, E.S., et al., *Science* 238 (1987) 1098-1104. Ácido isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminapentaacético rotulado com carbono 14 (MX-DTPA) é um exemplo de agente quelante para a conjugação de radionucleotídeo ao anticorpo. Vide WO 94/11026.

[00086] Em um outro aspecto, a invenção proporciona uma composição, por exemplo, uma composição farmacêutica contendo um anticorpo da presente invenção, formulada junto com um veículo farmacêuticamente aceitável.

[00087] As composições farmacêuticas da invenção podem ser também administradas em terapia de combinação, isto é, combinadas com outros agentes. Por exemplo, a terapia de combinação pode incluir uma composição da presente invenção com pelo menos um agente antitumoral, como um agente quimioterapêutico, um agente citotóxico ou um pró-fármaco ou outra terapia convencional.

[00088] Um "agente quimioterapêutico" é um composto químico útil no tratamento de câncer. Exemplos de agentes quimioterapêuticos incluem Adriamicina, Doxorrubicina, 5-Fluoruracil, Citosina arabinosídeo ("Ara-C"), Ciclofosfamida, Tiotepa, Taxotero (docetaxel), Bussulfano, Gencitabina, Citoxina, Taxol, Metotrexato, Cisplatina, Melfalano, Vim-

blastina, Bleomicina, Etoposídeo, Ifosfamida, Mitomicina C, Mitoxantrona, Vincreistina, Vinorelbina, Carboplatina, Teniposídeo, Daunomicina, Carminomicina, Aminopterina, Dactinomicina, Mitomicinas, Esperamicinas (vide a Patente US 4.675.187), Melfalano e outras mostardas nitrogenadas relacionadas.

[00089] O termo "agente citotóxico", como usado aqui, refere-se a uma substância que inibe ou impede a função das células e/ou causa a destruição das células. O termo tem o objetivo de incluir isótopos radiativos, agentes quimioterapêuticos, e toxinas tais como toxinas enzimaticamente ativas de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, ou fragmentos destas.

[00090] O termo "pró-fármaco", como usado neste relatório descritivo, refere-se a uma forma de precursor ou de derivado de uma substância farmacologicamente ativa que é menos citotóxica para as células tumorais em comparação com o fármaco parente e é capaz de ser enzimaticamente ativada ou convertida na forma parente mais ativa. Vide, por exemplo, Wilman, D. E., *Biochemical Society Transactions* 14 (1986) 375-382, e Stella, V. J. et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," *Directed Drug Delivery*, Borchardt, R. T. et al., (eds.), pp. 247-267, Humana Press, Clifton, N.J. (1985). Os pró-fármacos desta invenção incluem, mas sem limitação, pró-fármacos contendo fosfato, pró-fármacos contendo tiofosfato, pró-fármacos contendo sulfato, pró-fármacos contendo peptídeo, pró-fármacos modificados com D-aminoácido, pró-fármacos glicosilados, pró-fármacos de anel de β -lactama, pró-fármacos contendo fenoxiacetamida opcionalmente substituída ou pró-fármacos contendo fenilacetamida opcionalmente substituída, 5-fluorcitosina e outros pró-fármacos de 5-fluouridina que podem ser convertidos no fármaco livre citotóxico mais ativo. Exemplos de fármacos citotóxicos que podem ser derivatizados em uma forma de pró-fármaco para uso nesta invenção incluem, mas

sem limitação, aqueles agentes quimioterapêuticos descritos acima.

[00091] Como usado aqui, "veículo farmacologicamente ativo" inclui qualquer um e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes bactericidas e fungicidas, agentes isotônicos e retardadores de absorção, e similares que são fisiologicamente compatíveis. Preferivelmente, o veículo é adequado para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, parenteral, espinal ou epidérmica (por exemplo, por injeção ou infusão).

[00092] Um "sal farmacologicamente aceitável" refere-se a um sal que retém a atividade biológica desejada do anticorpo e não confere quaisquer efeitos toxicológicos indesejados (vide, por exemplo, Berge, S. M., et al., *J. Pharm. Sci.* 66 (1977) 1-19). Tais sais estão incluídos na invenção. Exemplos de tais sais incluem sais de adição de ácido e sais de adição de base. Sais de adição de ácido incluem aqueles derivados de ácidos inorgânicos atóxicos, tais como sais de cloridrato.

[00093] Uma composição da presente invenção pode ser administrada por uma variedade de métodos conhecida da técnica. Como será apreciado por aquele técnico especializado, a via e/ou o modo de administração variarão dependendo dos resultados desejados.

[00094] Para administrar um composto da invenção por certas vias de administração, pode ser necessário revestir o compostos com ou co-administrar o composto com um material para impedir a sua inativação. Por exemplo, o composto pode ser administrado a um paciente em um veículo apropriado, por exemplo, lipossomos, ou um diluente. Diluentes farmacologicamente aceitáveis incluem soluções salinas e aquosas para tampão.

[00095] Veículos farmacologicamente aceitáveis incluem soluções ou dispersões aquosas estéreis e pós estéreis para a preparação extemporânea de solução ou dispersão injetável estéril. O uso de tais meios e de agentes para substâncias farmacologicamente ativas é conhecido

da técnica.

[00096] As frases "administração parenteral" e "administrado parenteralmente", como usadas aqui, significam modos de administração diferentes de administração enteral e tópica, usualmente por injeção, e inclui, sem limitação, injeção e infusão intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intra-orbital, intracardíaca, interdérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, intra-espinhal, epidural, e intra-esternal.

[00097] Essas composições podem conter também adjuvantes tais como conservantes, agentes umectantes, agentes emulsificantes e agentes dispersantes. Prevenção da presença de microrganismos pode ser assegurada tanto por procedimentos de esterilização, supra, como pela inclusão de vários agentes bactericidas e fungicidas, por exemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, e similares. Pode ser também desejável incluir agentes isotônicos, tais como açúcares, cloreto de sódio e similares nas composições. Além disso, absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser obtida pela inclusão de agentes que retardam a absorção, tais como monoestearato e gelatina.

[00098] Independente da via de administração selecionada, os compostos da presente invenção, que podem ser usados em uma forma hidratada adequada, e/ou as composições farmacêuticas da presente invenção são formuladas nas formas de dosagem farmacêuticamente aceitáveis por métodos convencionais conhecidos daqueles versados na técnica.

[00099] Níveis de dosagem reais dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas da presente invenção podem ser variados de modo a obter uma quantidade do ingrediente ativo que é eficaz para a obtenção da resposta terapêutica desejada para um paciente particular, composição e modo de administração, sem ser tóxica para o paci-

ente. O nível de dosagem selecionado dependerá de uma variedade de fatores farmacocinéticos incluindo a atividade das composições particulares da presente invenção empregadas, a via de administração, o tempo de administração, a taxa de excreção do composto particular que está sendo empregado, a duração do tratamento, outros fármacos, compostos e/ou materiais usados em combinação com as particulares composições empregadas, a idade, sexo, peso, condição, saúde geral e histórico médico anterior do paciente que está sendo tratado, e fatores similares bem-conhecidos da técnica médica.

[000100] A composição deve ser estéril e fluida na medida em que a composição for administrável por seringa. Além de água, o veículo é preferivelmente uma solução salina tamponada isotônica.

[000101] Fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de revestimento tal como lecitina, por manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e pelo uso de tensoativos. Em muitos casos, é preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois tal como manitol ou sorbitol, e cloreto de sódio na composição.

[000102] Preferivelmente, um anticorpo completamente fucosilado de acordo com a invenção é útil para o tratamento de NSCLC (carcinoma de pulmão de não-pequenas células), preferivelmente em combinação com Erlotinib (Tarceva[®]), para o tratamento de câncer da mama, preferivelmente em combinação com Herceptin[®] (Trastuzumab), a tumores pancreáticos, preferivelmente em combinação com gencitabina (Gemzar[®]).

[000103] Os seguintes exemplos, figura e listagem de seqüências são fornecidos para auxiliar o entendimento da presente invenção, cujo verdadeiro escopo está estabelecido nas reivindicações apensas. É entendido que podem ser feitas modificações nos procedimentos descritos sem se desviar do espírito da invenção.

ExemplosLinhagens de células

[000104] A linhagem de célula parental usada para a geração de uma linhagem de célula para expressão de IgG recombinante é uma linhagem de células do ovário de hamster chinês (CHO), CHO-DG44 (Flintoff, W. F. et al., *Somat. Cell Genet.* 2 (1976) 245-261; Flintoff et al., *Mol. Cell. Biol.* 2 (1982) 275-285; Urlaub, G. et al., *Cell* 33 (1983) 405-412; Urlaub, G. et al., *Somat. Cell Mol. Genet.* 12 (1986) 555-566). Células CHO-DG44 perderam ambos os locais endógenos para a enzima Dihidrofolato Redutase (DHFR).

[000105] Células CHO-DG44 foram crescidas em Meio MEM alpha Minus (Gibco N° 22561), 10% de FCS dialisado (Gibco N° 26400-044) e 2 mmols/L de L-Glutamina, 100 μ M de Hipoxantina, 16 μ M de Timidina (suplemento HT).

[000106] Plasmídeos

[000107] O sistema de expressão compreendeu o promotor de CMV e está descrito na tabela 1. Como anticorpo foi usado um anticorpo contra IGF-1R (WO 2005005635; AK18 ou AK22).

Tabela 1

Bp	Elemento de Vetor/segmento de DNA
1-26	Sítios de restrição única: SgrAI, Sse83871
27-614	Promotor de citomegalovírus humano (HCMV) (CMV-prom) incluindo promotor de CMV IE humano
615-641	Ligante
642-780	Seqüência líder da cadeia pesada de Ig MURINA (I1, intron de seqüência de sinal, L2)
642-686	L1
687-768	Intron de sinal (SS intron)
769-780	L2

781-1105	Domínio de cadeia κ -leve variável do anticorpo IGF-1R (AK18)
1106-1140	Ligante
1141-3134	Intron 2 híbrido da cadeia leve kappa variável de humano/camundongo
2433-2913	Fragmento de intensificador κ
3135-3475	Ligante
3476-3795	Região constante da cadeia leve κ (C-kappa)
3796-4098	Seqüência de poliadenilação da cadeia leve κ da Ig humana (C-kappa pA)
4099-4137	Ligante
4138-5800	Resistência à higromicina
4138-4485	Promotor de SV40 (SV40 Prom) incl. repetição de 72 bp, TATA, origem de SV40
4486-4502	Ligante
5403-5528	Higromicina-B-fosfotransferase (Hyg)
5529-5535	Ligante
5536-5795	Sinal de poliadenilação de SV40 (SV40 pA)
5796-5800	Ligante
5801-6944	Diidrofolato redutase (DHFR) murina
5801-6088	Promotor de SV40 (SV40 Prom) incl. repetição encurtada de 72bp, origem de SV40
6089-6105	Ligante
6106-6672	Gene de DHFR murina (DHFR murina)
6673-6679	Ligante
6680-6944	Sinal de poliadenilação de SV40 (SV40 pA)
6945-7181	Ligante

7182-8941	Origem bacteriana de replicação e marcador seletivo derivado do plasmídeo pUC18
7182-7792	Origem de replicação („origem pUC")
7793-7939	Ligante
7940-8847	Gene de β -lactamase (Ap(r))
8848-8941	Ligante
8942-9529	Promotor de citomegalovírus humano (HCMV) (CMV-Prom) incluindo o promotor CMV IE humano incluindo 5'-UTR sintética
9530 - 9556	Ligante
9557-9696	Seqüência líder da cadeia pesada de Ig murina (L1, intron de seqüência de sinal, L2)
9557-9602	L1
9603-9685	Intron de sinal (SS intron)
9686-9696	L2
9679-10051	Domínio da cadeia pesada de IgG1 variável do anti-corpo IGF-1R (AK18)
10052-10085	Ligante
10086-11682	Intron 2 híbrido da cadeia pesada de humano/camundongo incluindo a parte da região de segmento J da cadeia pesada de Ig de camundongo que inclui o elemento intensificador da cadeia pesada de Ig (parte JH ₃ , JH ₄) Elemento intensificado da cadeia pesada de Ig de camundongo
11683-11909	Ligante
11910-13504	Região constante da cadeia pesada de IgG1 humana (CH ₁ -Hinge-CH ₂ -CH ₃)
11910-12203	CH1
12594-12638	Hinge

12757-13086	CH2
13184-13504	CH3 (sítio de <i>splice</i> alternativo deletado)
13505-13967	Seqüência de poliadenilação de cadeia pesada da IgG1 humana (IgG1 pA)
13968-13970	SgrAI-Ligante

Exemplo 1

Transfecção e Seleção

[000108] A transfecção do plasmídeo de expressão foi efetuada com Fugene (Roche Diagnostics GmbH). Um dia depois da transfecção, células DG44 foram colocadas sob pressão de seleção consistindo em Meio MEM alpha Minus, 10% de FCS dialisado e 2 mmols/L de L-glutamina e Metotrexato a 20nM (MTX). Depois de 3 semanas sob pressão de seleção, clones simples foram colhidos da placa e expandidos.

[000109] Sobrenadantes foram coletados e a presença do anticorpo foi analisada com ELISA específico para IgG humana. Subclones foram ainda expandidos e analisados para a produção de anticorpo específico.

[000110] Os clones foram adaptados para crescimento em cultura em suspensão e meio isento de soro, HyQ SFM4 CHO-Utility (HyClone nº SH30516) contendo MTX a 20nM. Em paralelo, o perfil glicopadrão foi determinado. Os subclones foram selecionados proporcionando a desfucosilação de 2,0% ou menos (com referência à quantidade de oligossacarídeo molar total).

Exemplo 2

Cultivo e Purificação

[000111] 3×10^5 células foram crescidas em frascos para agitação de 125 mL (Corning) preenchidos com 30 mL de meio a 37°C, 5% de CO₂, 100 rpm, por 10 dias. A densidade celular foi medida por Contador CASY e o sobrenadante foi colhido para determinação da concentração de anti-

corpo por cromatografia por afinidade com a proteína A. Cerca de 20 mL de cada sobrenadante foram purificados para posterior caracterização bioquímica por cromatografia com Proteína A (equilíbrio com PBS, lavagem com tampão de citrato de sódio a 25mM pH 5,2, eluição com tampão de citrato de sódio a 100mM pH 2,8, CIP com NaOH a 10mM).

Exemplo 3

Análise da glicoestrutura do anticorpo

[000112] O material de anticorpo purificado foi analisado por análise de mapa de peptídeo por Cromatografia Líquida/Espectrometria de Massa. As amostras foram reduzidas (TRIS/HCl a 0,4M, Guanidina/HCl a 8M, pH 8,5, DTT (3 mg/mL)), carboximetiladas (ácido iodoacético) e clivadas com tripsina. A mistura de peptídeo-glicopeptídeo foi separada com RP-HPLC e analisada *online* com espectrometria de massa eletrospray-. Os espectros m/z da glicoestrutura contendo o peptídeo foram integrados e os resultados são dados na Tabela 2.

Tabela 2

Quantidade relativa de variantes de glicosilação

Clone N°	G0 [%]	G1 [%]	G2 [%]	NonFuc[%]	Man ¹ [%]
1	38,4	51,4	10,2	0,1	0,5
2	44,3	47,6	8,1	0,1	0,6
3	42,8	48,7	8,5	0,2	0,8
4	49,2	43,6	7,2	0,3	1,2
5	62,7	33,0	4,3	0,6	1,0
6	60,4	35,5	4,2	0,5	1,2
7	40,4	49,8	9,8	0,3	0,6
8	46,9	45,9	7,3	0,3	1,1

Man: Estruturas com alto teor de manose compreendendo entre quatro e cinco resíduos de manose, respectivamente.

[000113] G0, G1, G2: cadeias pesadas reduzidas com carboidrato do tipo de complexo diantênario fucosilado com 1, 2 ou 3 resíduos de galac-

tose terminais.

[000114] nonFuc: cadeias pesadas reduzidas com carboidrato do tipo complexo dianténario sem fucose.

[000115] O clone 5 da linhagem de células CHO (hu MAV<IGF-1R>B1-4E10_9-16) foi depositado sob o Tratado de Budapeste sobre reconhecimento internacional do depósito de microrganismos para fins de procedimento patentário, com Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Alemanha, em 21 de junho de 2006 sob N° de Acesso DSM ACC 2795.

[000116] Os meios usados para cultivar os clones diferentes foram obtidos da Hyclone (HyQ SFM4 CHO-Utility, usado para os clones 4-6) ou Sigma (C-8862 usados para os clones 1-3 e 7).

[000117] A análise de mapa de peptídeo por LCMS foi realizada por integração dos cromatogramas de íon específico de todos os estados de carga para todos os glicopeptídeos.

[000118] GlcNac de bissecção, NGNA e alta manose foram determinados de mesmo modo.

[000119] GlcNac de bissecção e NGNA não foram detectáveis. Assim, a quantidade de NGNA é 0,5% ou inferior, e é também 0,1% ou inferior. A quantidade de GlacNac de bissecção é também 0,5% ou inferior, e 0,1% ou inferior.

[000120] Um exemplo de cálculo de glicosilação é mostrado na Tabela 3 (Tabela 3a: clone 3, Tabela 3b: clone 5; peptídeo compreendendo asn298, designado como H27).

	Área z=2	Área z=3	Área z=4	Soma	% de Quantidade Relativa
H27_G0	616	198	0	814	28,7
H27_G1	734	425	0	1158	40,9
H27_G2	103	135	0	238	8,4

H27_G3	0	0	0	0	0,0
H27_G4	0	0	0	0	0,0
H27_G1_1NGNA	0	0	0	0	0,0
H27_G2_1NGNA	0	0	0	0	0,0
H27_G2_2NGNA	0	0	0	0	0,0
H27_G3_1NGNA	0	0	0	0	0,0
H27_G3_2NGNA	0	0	0	0	0,0
G0 sem GlcNAc e sem Man	0	57	0	57	2,0
G0 sem GlcNAc	330	0	0	330	11,7
G1 sem GlcNAc	208	0	0	208	7,4
Man5	22	0	0	22	0,8
G0 sem Fuc	5	0	0	5	0,2
G1 sem Fuc	0	0	0	0	0,0
Man4	0	0	0	0	0,0
total				2833,15	100,00

quantidade relativa de glicoestruturas com NGNA	0,0
quantidade relativa de glicoestruturas com Galactoses (G3 e G4)	0,0
quantidade relativa de manose alta	0,8
quantidade relativa de G0 sem Fuc e G1 sem Fuc	0,2

Soma G0	42,4
Soma G1	48,2
Soma G2	8,4
Soma Total	99,0
Relacionado a 100% de G0-1-1	
G0	42,8
G1	48,7

G2	8,5
Soma sem Man	99,2
Soma G0/1 sem Fuc	0,2
Quantidade relativa Sem Fuc	0,2

Área: área de pico

[000121] H27_ G0_ H27_ G4: Glicopeptídeo H27 (contendo Asn298) com carboidrato do tipo complexo diantênario fucosilado com galactose x-terminal (por exemplo, G4 com 4 unidades de galactose)

[000122] Quantidade relativa sem Fuc: percentagem de Fuc em relação a todos os G0, G1, G2 sem glicoesutura de manose (4 e 5) (alta manose).

[000123] H27_ G1-1NGNA – H27_ G3_ 2NGNA: Glicopeptídeo H27 (contendo Asn298) com carboidrato do tipo complexo diantênario fucosilado com unidades de galactose x-terminal (por exemplo, G2 com 2 unidades) compreendendo um a dois ácidos N-glicolil-neuramínicos.

[000124] Quantidade relativa sem Fuc: percentagem de Fuc em relação dos todos os G0, G1, G2 sem glicoesutura de manose (4 e 5) (manose alta).

Tabela 3b

Exemplo de cálculo de glicosilação (clone 5)

	Área z=2	Área z=3	Área z=4	Soma	Quantidade Relativa [%]
G0 ¹⁾	1109	318	0	1426	43,8
G1 ¹⁾	579	319	0	897	27,6
G2 ¹⁾	67	71	0	139	4,3
G3 ¹⁾	0	0	0	0	0,0
G4 ¹⁾	0	0	0	0	0,0
G1_1NGNA ²⁾	0	0	0	0	0,0
G2_1NGNA ²⁾	0	0	0	0	0,0

G2_2NGNA ²⁾	0	0	0	0	0,0
G3_1NGNA ²⁾	0	0	0	0	0,0
G3_2NGNA ²⁾	0	0	0	0	0,4
G0-GlcNAc-Msn ³⁾	0	95	0	95	2,9
G0-GlcNAc ³⁾	485	0	0	485	14,9
G1-GlcNAc ³⁾	159	0	0	159	4,9
Man5 ⁴⁾	32	0	0	32	1,0
G0-Fuc ⁵⁾	11	0	0	11	0,3
G1-Fuc ⁵⁾	9	0	0	9	0,3
Man4 ⁴⁾	0	0	0	0	0,0
Total				3253,88	100,00
G0					62,7
G1					33,0
G2					4,3
glicoestruturas sem fucose					0,6
glicoestruturas compreendendo NGNA					0,0
glicoestruturas compreendendo hexoses adicionais (G3+G4)					0,0
glicoestruturas de manose alta					1,0

¹⁾glicoestrutura do tipo complexo diantenário fucosilado com galacose x-terminal (0, 1, 2, 3, e 4, respectivamente)

²⁾glicoestrutura do tipo complexo diantenário fucosilado com galacose x-terminal (0, 1, 2, 3, e 4, respectivamente) com resíduos de ácidos n-glicolil neuramínico

³⁾glicoestruturas do tipo complexo diantenário fucosilado

(principalmente produtos do método)

⁴⁾estruturas de manose alta compreendendo quatro ou cinco resíduos, respectivamente

⁵⁾glicoestruturas não fucosiladas

Exemplo 4

Determinação das funções efetoras mediadas pelo anticorpo por anti-IGF-IR HuMAbs

[000125] De modo a determinar a capacidade dos anticorpos HuMAb gerados de elicitarem os mecanismos imunoefetores, foram realizados estudos de citotoxicidade de célula dependente de anticorpo (ADCC).

[000126] Para estudar os efeitos dos anticorpos em ADCC, células de câncer da próstata DU145 (HTB-81 ATCC; 1×10^6 em 2 a 4 mL de RPMI-FM) expressando IGF-IR foram marcadas com 1 μ L de solução de 2,2':6',6"-terpiridina-6,6"-dicarboxilato de bis(acetoximetila) (BTDA) por 25 minutos, a 37°C, em uma incubadora de células. As células foram lavadas, quatro vezes, com 10 mL de RPMI-FM e giradas por 10 minutos a 200 xg com freio. Depois disso, as células foram ajustadas para uma concentração de 1×10^5 células por mL. Cinco mil células foram plaqueadas por cavidade em uma placa de fundo redondo correspondente a um volume de 50 μ L. Anticorpos HuMAb foram adicionados em uma concentração final variando de 25-0,1 ng/mL em um volume de 50 μ l de meio de cultura de células. Subseqüentemente, 50 μ L de células efetoras, PBMC recentemente isoladas de sangue integral ou de células efetoras purificadas de cremes leucocitários foram adicionados em uma razão de E:T na faixa de 25:1. As placas foram imediatamente centrifugadas por 1 minuto a 200 xg com freio, e incubadas por 2 horas a 37°C. Depois da incubação, as células foram giradas por 10 minutos a 200 xg e 20 μ L de sobrenadante foram transferidos para uma placa de microtitulação Optiplate 96-F. Duzentos microlitros de solução de Europium (na temperatura ambiente) foram adicionados e a mistura foi incubada por 15 minutos em um

agitador. A fluorescência resultante foi medida em um fluorímetro resolvido por tempo usando o protocolo EU-TDA da Perkin Elmer.

[000127] A magnitude de lise celular por ADCC é expressa como % da liberação máxima de TDA das células-alvo lisadas por detergente, corrigida para liberação espontânea do 2,2':6',2"-terpiridina-6,6"-dicarboxilato (TDA) das células-alvo, respectivas. Como referência padrão de um anticorpo mostrando "não ADCC" é usado um anticorpo (monoclonal) contra KLH (hemocianina de lapa californiana) do mesmo tipo de IgG ou uma mistura de IgG isolada de cerca de 35.000 doadores ("Redimmune"). Um anticorpo 75% livre de fucose mostrou uma liberação de TDA que está dentro de 3xDP da liberação de TDA do anticorpo-padrão (Figura 1).

Exemplo 5

Determinação da afinidade de anticorpos anti-IGF-IR por IGF-IR

Instrumento: BIACORE® 3000

Chip: CM5

Acoplamento: acoplamento de amina

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

[000128] Para medições de afinidade, anticorpos FC γ anti-humanos (de coelho) foram acoplados à superfície do chip para apresentação do anticorpo contra IGF-IR. O domínio extracelular de IGF-IR foi adicionado em várias concentrações em solução. A associação foi medida por injeção de IGF-IR de 3 minutos; a dissociação foi medida por lavagem da superfície do chip com tampão por 5 minutos. Os dados de afinidade para os anticorpos 18 e 22 estão mostrados na Tabela 4.

Tabela 4

Dados de afinidade medida por SPR (BIACORE® 3000)

Anticorpo	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	$1,47 \times 10^5$	$9,64 \times 10^{-5}$	$6,56 \times 10^{-10}$

Exemplo 6

Inibição da ligação de IGF-I e IGF-II às células tumorais que expressam IGF-IR

[000129] De modo a determinar a capacidade do anticorpo da invenção de bloquear a ligação dos ligantes IGF-I e IGF-II ao receptor de IGF-I (IGF-IR), foram realizados experimentos de competição do peptídeos ligantes rotulados radiativamente.

[000130] Células tumorais humanas (HT29, NCI H322M, 0,5 a 1 x 10⁵ células/mL) foram plaqueadas em meio RPMI 1640 (PAA, Cat. N° E15-039) suplementado com L-Glutamina a 2mM, 1 x de aminoácidos não-essenciais (Gibco, Cat. N° 11140-035), piruvato de sódio a 1mM (Gibco, Cat. N° 11360-039) e 10% de FCS termoinativado (PAA, Cat. N° A15-771). Seis garrafas no formato T175 foram inoculadas com 20 mL de células no meio respectivo para cada experimento e cultivadas por dois dias a 37°C e 5% de CO₂ para obter monocamadas de células confluentes.

[000131] Para coletar células individuais, 2 mL de 1x Tripsina/EDTA (Gibco, Cat N° 25300-054) por frasco T175 foram adicionados e o desprendimento das células foi monitorado com microscópio Axiovert25. As células foram coletadas e o meio com 10% de FCS como descrito anteriormente foi adicionado para um volume total de 50 mL. As células foram reisoladas por centrifugação, durante 10 minutos, a 1.000 rpm (Heraeus, Omnifuge 2.0 RS) e ressuspensas em 50 mL de tampão de ligação (NaCl a 120mM, KCl a 5mM, MgSO₄ a 1,2mM, EDTA a 1mM, D(+)glicose a 10mM, NaAc a 15mM, Hepes a 100mM pH 7,6, 1% de BSA). As células foram contadas, reisoladas por centrifugação e ajustadas com tampão de ligação para 1 x 10⁶ células/mL.

[000132] Peptídeos de IGF-I e IGF-II rotulados com I¹²⁵ (Amersham, ~2.000 de Ci/mmol, Cat N° IM172 e IM238), solubilizados em 0,1% de CH₃COOH, foram diluídos em tampão de ligação para uma atividade

final de 4×10^5 contagens/(minuto x mL). Setenta e cinco microlitros de anticorpo nas concentrações especificadas juntamente com 25 μ L de peptídeo de IGF-I ou de IGF-II rotulado com I^{125} pré-diluído foram adicionados a 200 μ L de suspensão de células e incubados por 3,5 h, a 4°C. As células foram resisoladas por centrifugação por 5 minutos a 2.000 rpm (Eppendorf, 5415C) e o sobrenadante removido. Depois de lavagem, duas vezes, em 1 mL de tampão de ligação, as células foram ressuspensas em 1 mL de tampão de ligação e transferidas para tubos de cintilação. A quantidade de peptídeo radiativo ligado aos receptores de superfície de células foi medida em um contador de cintilação.

[000133] O valor IC_{50} médio para o anticorpo 18 é de 0,3nM. Não pode ser observada nenhuma inibição detectável para ligação de IGF-II.

Exemplo 7

Ensaio de competição anticorpo para ligação de IGF-IR

[000134] Para mapeamento de epítipo de anticorpos monoclonais anti-IGF-IR, um formato similar para a medição de afinidade (Exemplo 5) foi selecionado, mas IGF-IR foi pré-incubado por pelo menos 0,5h à temperatura ambiente com o anticorpo em solução. Essa mistura foi injetada e ligação (ou inibição) ao IGF-IR foi detectada. Esse ensaio permite medir a atividade inibidora recíproca de anticorpos monoclonais para ligação ao IGF-IR. Foi verificado que os anticorpos da invenção competem para ligação ao IGF-IR com α IR3, um anticorpo que é conhecido por ligar-se a aa 217-274 (Gustafson, T.A., e Rutter, W.J., J. Biol. Chem. 265 (1990) 18663-18667).

Exemplo 8

Inibição de fosforilação mediada por IGF-I de IGF-IR e Akt/PKB

[000135] De modo a determinar a capacidade do anticorpo da invenção de inibir a ativação e fosforilação do receptor de IGF-I (IGF-IR), experimentos de competição foram realizados com peptídeo de IGF-I e

subseqüente análise de Western blotting com anticorpos específicos para tirosina fosforilada.

[000136] Células tumorais humanas (HT29, NCI H322M, 5×10^4 células/mL) foram plaqueadas em meio RPMI 1640 (PAA, Cat. N° E15-039) suplementado com L-Glutamina a 2mM, 1 x de aminoácidos não essenciais (Gibco, Cat. N° 11140-035), piruvato de sódio a 1mM (Gibco, Cat. N° 11360-039) e 0,5% de FCS termoinativado (PAA, Cat. N° A15-771). Para determinação dos valores IC_{50} , placas de 12 cavidades foram incubadas com 1 mL de células no meio respectivo para cada experimento e cultivadas por dois dias, a 37°C e 5% de CO_2 .

[000137] Depois de 48 horas de cultivo com meio de soro baixo, o meio foi cuidadosamente removido e substituído por concentrações diferentes de anticorpo diluídos no meio respectivo. Depois de 5 minutos a 37°C e 5% de CO_2 , peptídeo de IGF-I foi adicionado em uma concentração final de 2nM e as células foram novamente incubadas por 10 minutos sob as condições mencionadas acima. O meio foi cuidadosamente removido por aspiração e 100 μ L de tampão de lise gelado foram adicionados por cavidade (Hepes a 50mM pH 7,2, NaCl a 150mM, EGTA a 1mM, 10% de glicerol, 1% de Triton[®]-X100, NaF a 100mM, $Na_4P_2O_7$ a 10mM, inibidor de protease Complete[®]). As células foram desprendidas usando um raspador de células (Corning, Cat. N° 3010) e os conteúdos das cavidades foram transferidos para tubos de reação Eppendorf. Fragmentos de células foram removidos por centrifugação por 10 minutos, a 13.000 rpm e a 4°C e metade do sobrenadante foi adicionada a 2x tampão de amostra Laemmli em uma razão 1:1 (v/v). Para imunoprecipitação do IGF-IR, o sobrenadante remanescente do lisado de células foi submetido a uma rotação de clarificação (10 minutos, a 13.000 rpm e a 4°C) imediatamente antes de 1 μ L de um anticorpo policlonal contra IGF-IR β (C-20, Santa Cruz Biotechnologies) ou de um anticorpo monoclonal murino (IgG1) que reconhece um

epítopo dentro dos aminoácidos 440-586 do domínio extracelular (α -cadeia) do Receptor do Tipo 1 de IGF humano ser adicionado (mAb 24-55, GroPep). Depois de 2 horas de incubação a 4°C, em um tubo de reação Eppendorf, em rotação, 25 μ L de contas de Proteína G Sepharose® (Amersham Biosciences, Cat. N° 17-0618-01) foram adicionados seguidos por uma outra etapa de incubação de 1 hora a 4°C. As contas com complexos de anticorpo-proteína ligados foram isoladas por centrifugação (1 minuto a 2.000 rpm e 4°C) e lavadas três vezes com tampão de lavagem (tampão de lise com somente 0,1% de Triton®-X100). Depois de ferver as contas em tampão de amostra Laemmli, proteínas celulares foram separadas por SDS-PAGE e transferidas a uma membrana de nitrocelulose (PROTRAN® BA 85, Schleicher&Schuell) por Western blotting semi-seco.

[000138] Um anticorpo específico de fosfotirosina (Upstate, clone 4G10, Cat. N° 05-321) foi usado para determinar o estado da fosforilação do IGF-IR imunopurificado. Para a detecção de Akt/PKB fosforilado, foi aplicado um anticorpo com especificidade para Ser473 fosforilada (Cell Signalling, Cat. N° 9271).

[000139] Foi verificado que o anticorpo 18 pode inibir a fosforilação mediada por IGF-1 de IGF-1R e PKB com uma IC₅₀ de 0,6nM.

Exemplo 9

Indução de infra-regulação mediada por anticorpo de IGF-IR *in vitro*

[000140] De modo a detectar os efeitos do anticorpo da invenção sobre a quantidade de receptor de IGF-I (IGF-IR) em células tumorais, foram realizados experimentos de tempo-curso e subsequente análise de Western blotting com anticorpos específicos para IGF-IR.

[000141] Células tumorais humanas (HT29, 5 x 10⁴ células/mL) em meio RPMI 1640 (PAA, Cat. N° E15-039) suplementado com L-Glutamina a 2mM, 1 x de aminoácidos não essenciais (Gibco, Cat. N° 11140-035), piruvato de sódio a 1mM (Gibco, Cat. N° 11360-039) e

10% de FCS termoinativado (PAA, Cat. N° A15-771). Para cada período de incubação, uma placa de 12 cavidades foi inoculada com 1 mL de células no meio respectivo para cada experimento e cultivada por 24 horas, a 37°C, e 5% de CO₂.

[000142] O meio foi cuidadosamente removido e substituído por concentrações diferentes de anticorpo diluído no meio respectivo. Em duas cavidades de controle, o meio foi substituído ou por meio sem anticorpo ou por meio com um anticorpo de controle (AB-1, Oncogene, Cat. N° GR11). As células foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ e placas individuais foram tiradas para posterior processamento depois de 15 minutos, 24 horas e 48 horas.

[000143] O meio foi cuidadosamente removido por aspiração e 100 µL de tampão de lise gelado foram adicionados por cavidade (Hepes a 50mM pH 7,2, NaCl a 150mM, EGTA a 1mM, 10% de glicerol, 1% de Triton[®] -X100, NaF a 100mM, Na₄P₂O₇ a 10mM, inibidor de protease Complete[®]). As células foram desprendidas usando um raspador de células (Corning Cat. N° 3010) e os conteúdos das cavidades transferidos para tubos de ensaio Eppendorf. Os fragmentos de células foram removidos por centrifugação por 10 minutos, a 13.000 rpm, e a 4°C e o sobrenadante foi adicionado a 2x tampão de amostra Laemmli em uma razão 1:1 (v/v). As proteínas celulares foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (PROTRAN[®] BA 85, Schleicher&Schuell, Cat. N° 10 401196) por Western blotting semi-seco.

[000144] Um anticorpo específico para IGF-IR (C-20, Santa Cruz Biotechnologies, Cat. N° sc-713) foi usado para determinar os níveis de proteína de IGF-IR.

[000145] Foi observada infra-regulação do IGF-IR induzida pelo anticorpo da invenção depois de menos de 24 horas após a adição do anticorpo.

Exemplo 10

Inibição da ligação de insulina a células 3T3 que expressam receptor de insulina humana

[000146] De modo a determinar se o anticorpo da invenção também bloqueia a ligação de insulina ao receptor de insulina (IR), foram realizados experimentos de competição com um peptídeo de ligante rotulado radiativamente.

[000147] Células 3T3 (1×10^5 /mL) expressando recombinantemente altos números ($>10^5$) de IR humana foram plaqueadas em um meio Dulbecco MEM (DMEM) com glicose alta (PAA, Cat. N° E15-009) suplementado com L-glutamina a 2mM (Gibco, Cat. N° 25030-024) e 10% de FCS termoinativado (PAA, Cat. N° A15-771). Seis garrafas no formato T175 foram inoculadas com 20 mL de células no meio respectivo para cada experimento e cultivadas por dois dias a 37°C e 5% de CO₂ para obter monocamadas de células confluentes.

[000148] Para coletar células individuais, 2 mL de 1x Tripsina/EDTA (Gibco, Cat N° 25300-054) por frasco T175 foram adicionados e o desprendimento das células foi monitorado com microscópio. As células foram coletadas e o meio com 10% de FCS como descrito anteriormente foi adicionado para um volume total de 50 mL. As células foram reisoladas por centrifugação, durante 10 minutos, a 1.000 rpm e res-suspensas em 50 mL de tampão de ligação (NaCl a 120mM, KCl a 5mM, MgSO₄ a 1,2mM, EDTA a 1mM, D(+) glicose a 10mM, NaAc a 15mM, Hepes a 100mM pH 7,6, 1% de BSA). As células foram contadas, reisoladas por centrifugação e ajustadas com tampão de ligação para 1×10^6 células/mL.

[000149] Peptídeos de insulina rotulados com I¹²⁵ (Amersham, Cat. N° IM166, ~2.000 de Ci/mmol), solubilizados em 0,1% de CH₃COOH, foram diluídos em tampão de ligação para uma atividade final de 4×10^5 contagens/ (minuto*mL). Setenta e cinco microlitros de anticorpo

juntamente com 25 μL de peptídeo de insulina foram adicionados a 200 μL de suspensão de células (concentração de anticorpo final de 200nM) e incubados por 3,5 h, a 4°C. As células foram reisoladas por centrifugação por 5 minutos a 2.000 rpm e o sobrenadante removido. Depois de lavagem, duas vezes, em 1 mL de tampão de ligação, as células foram ressuspensas em 1 mL de tampão de ligação e transferidas para tubos de cintilação. A quantidade de peptídeo radiativo ligado aos receptores de superfície de células foi medida em um contador de cintilação.

[000150] Os resultados demonstram que o anticorpo da invenção não interfere com a ligação de insulina ao receptor de insulina.

Exemplo 11

Nenhum estímulo de IGF-IR e fosforilação de Akt/PKB

[000151] De modo a excluir as atividades estimuladoras de IGF-IR do anticorpo da invenção, fosforilação do IGF-IR foi determinada em ausência do ligante de IGF-I, mas em presença do anticorpo da invenção e um anticorpo de referência (αIR3 , Oncogene, Alemanha). Isso foi realizado por análise de Western blotting com anticorpos específicos para o estado de fosforilação. Células 3T3 (ATCC CRL 1658) transfectadas com IGF-IR (5×10^4 cells/mL, Pietrkowski, Z., et al., *Cell Growth Differ.* 4 (1992) 199-205) foram plaqueadas em meio Dulbecco MEM (DMEM) com glicose alta (PAA, Cat N° E15-009) suplementado com L-Glutamina a 2mM (Gibco, CatNo. 25030-024) e 0,5% de FCS termoinativado (PAA, Cat N° A15-771) ou células tumorais humanas (HT29, NCI H322M, 5×10^4 /mL) em meio RPMI 1640 (PAA, Cat N° E15-039) suplementado com L-Glutamina a 2mM, 1x de aminoácidos não-essenciais (Gibco, Cat N° 11140-035), piruvato de sódio a 1mM (Gibco, Cat N° 11360-039) e 0,5% de FCS termoinativado (PAA, Cat N° A15-771). Para determinação dos valores IC_{50} , placas de 12 cavidades foram inoculadas com 1 ml de células no meio respectivo para cada ex-

perimento e cultivadas por dois dias a 37°C e 5% de CO₂.

[000152] Depois de 48 horas de cultivo com meio de soro baixo, o meio foi cuidadosamente removido e substituído por concentrações diferentes de anticorpo diluído no meio respectivo. As células foram incubadas por 15 minutos sob as condições mencionadas acima. O meio foi cuidadosamente removido por aspiração e 100 µL de tampão de lise gelado foram adicionados por cavidade (Hepes a 50mM pH 7,2, NaCl a 150mM, EGTA a 1mM, 10% de glicerol, 1% de Triton[®]-X100, NaF a 100mM, Na₄P₂O₇ a 10 mM, inibidor de protease Complete[®]). As células foram desprendidas usando um raspador de células (Corning, Cat. N° 3010) e os conteúdos das cavidades foram transferidos para tubos de ensaio Eppendorf. Fragmentos de células foram removidos por centrifugação por 10 minutos, a 13.000 rpm e a 4°C (centrífuga Eppendorf 5415R) e metade do sobrenadante foi adicionada a 2x de tampão de amostra Laemmli em uma razão 1:1 (v/v). Para imunoprecipitação do IGF-IR, o sobrenadante remanescente dos lisados de células foi submetido a uma rotação de clarificação (10 minutos, a 13.000 rpm e a 4°C) imediatamente antes de 1 µL de um anticorpo policlonal contra IGF-IRβ ser adicionado (C-20, Santa Cruz Biotechnologies, Cat. N° sc-173 ou mAb 24-55, GroPep. Cat. N° MAD1). Depois de 2 horas de incubação a 4°C, em um tubo de reação Eppendorf, em rotação, 25 µL de contas de Proteína G Sepharose[®] (Amersham Biosciences, Cat. N° 17-0618-01) foram adicionados seguidos por uma outra etapa de incubação de 1 hora a 4°C. As contas com complexos de anticorpo-proteína ligados foram isoladas por centrifugação (1 minuto a 2.000 rpm e 4°C) e lavadas três vezes com tampão de lavagem (tampão de lise com somente 0,1% de Triton[®]-X100). Depois de ferver as contas em tampão de amostra Laemmli, proteínas celulares foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (PROTRAN[®] BA 85, Schleicher&Schuell, Cat. N° 10 401196) por Wes-

tern blotting semi-seco.

[000153] Um anticorpo específico de fosfotirosina (Upstate, clone 4G10, Cat. N° 05-321, reconhecendo proteína fosforiladas em tirosina) foi usado para determinar o estado da fosforilação do IGF-IR imunopurificado. Para a detecção de Akt/PKB fosforilado, foi aplicado um anticorpo contra Akt1 com especificidade para Ser473 fosforilada (Cell Signalling, Cat. N° 9271).

[000154] Foi observado que a Akt/PKB cinase a jusante na via de sinalização do IGF-IR foi ativada significativamente pelo anticorpo de referência em concentrações mais altas que 5nM, mas não pelo anticorpo da invenção, em concentrações até 10.000nM.

Exemplo 12

Indução de infra-regulação do receptor em modelos de xenoenxerto H322M

[000155] Tumores foram induzidos em camundongos nús ("nude") e tratados uma vez com concentrações diferentes do anticorpo da invenção. Vinte e quatro horas depois do tratamento, os tumores foram extraídos e homogeneizados sob nitrogênio líquido. Tampão de lise gelado foi adicionado (Hepes a 50mM pH 7,2, NaCl a 150mM, EGTA a 1mM, 10% de glicerol, 1% de Triton[®]-X100, NaF a 100mM, Na₄P₂O₇ a 10 mM, inibidor de protease Complete[®], PMSF a 1mM) em uma razão de volume de tampão para peso de tumor de 3:1 e inteiramente misturados com o homogeneizado de tumor em descongelamento. Depois de solubilizar, o tecido por 15 minutos sobre gelo, fragmentos insolúveis foram removidos por centrifugação por 10 minutos, a 13.000 rpm e a 4°C (centrífuga Eppendorf 5415R). A concentração de proteína das amostras foi determinada com os Reagentes Micro BCA[®] (Pierce), e tampão de lise foi adicionado para ajuste de concentrações iguais. Parte do sobrenadante foi adicionada a 2x de tampão de amostra Laemmli em uma razão de 1:1 (v/v). As proteínas celulares foram sepa-

radas por SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (PROTRAN BA 85, Schleicher&Schuell, Cat. N° 10 401196) por Western blotting semi-seco. Um anticorpo específico de IGF-IR (C-20, Santa Cruz Biotechnologies, Cat. N° sc-713) foi usado para detectar IGF-IR.

[000156] Mediante tratamento com o anticorpo da invenção, foi observado um decréscimo dependente de concentração dos níveis de IGF-IR com uma EC50 estimada em 0,6 mg/kg.

Exemplo 13

Inibição de crescimento de tumores H322M

[000157] Os efeitos do anticorpo 18 *in vivo* foram investigados por indução de tumores em camundongos nús atímicos de acordo com métodos estabelecidos. Células H322M NSCLC humanas foram co-injetadas juntas com Matrigel, subcutaneamente, em camundongos nu atímicos de 6 a 7 semanas de idade (nu/nu). Para esse propósito, 5×10^6 células H322M foram concentradas em 100 μ L de Matrigel. Duzentos microlitros dessa mistura foram injetados nos flancos direitos dos camundongos. O volume de tumor foi calculado por medição dos diâmetros tumorais com calibradores Vernier, duas vezes na semana, de acordo com a fórmula publicada por Geran et al. ("Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems", Cancer Chemother. Rep. 11.301, 1972), onde o volume do tumor [mg] = (comprimento x largura)².

[000158] O anticorpo foi administrado intraperitonealmente (i.p.) a 10 mL/kg. O tratamento foi iniciado com doses duplas do anticorpo administrado em volumes duplos. Os tumores foram induzidos em camundongos nús conforme descrição acima. Depois dos tumores terem crescidos para um volume médio de 160 mg, os camundongos foram tratados intraperitonealmente seis vezes, uma vez por semana com 6, 0,6 e 0,06 mg/kg de anticorpo como doses consecutivas começando

com 12, 1,2 e 0,12 mg/kg como dose inicial dada uma vez no primeiro dia do tratamento. O experimento demonstra que o bloqueio do eixo do IGF-IR por mAb 18 anti-IGF-IR rhu resulta em eficácia antitumoral quando administrado como um agente único em 6 e 0,6 mg/kg. Em contraste, 0,06 mg/kg não teve efeito sobre o crescimento de tumor.

[000159] Além disso, o anticorpo 18 foi testado em combinação com gencitabina no mesmo modelo. Os tumores foram induzidos conforme descrição acima e o tratamento foi iniciado, quando os tumores haviam sido estabelecidos, uma vez por semana i.p., em 6 e 0,6 mg/kg e em combinação com 62 mg/kg de gencitabina em 0,6 mg. Gencitabina foi administrada, um ciclo, isto é, a cada três dias por quatro vezes no total. O tratamento foi iniciado por administração de doses duplas. O experimento demonstrou que o tratamento com o anticorpo 18 administrado uma vez a cada sete dias inibe o crescimento do tumor por ele mesmo e intensifica a eficácia da gencitabina, um composto anti-metabólico conhecido.

Exemplo 14

Inibição do crescimento de tumores 3T3

[000160] Os tumores foram induzidos em camundongos nús essencialmente conforme descrito no Exemplo 15, exceto que fibroblastos 3T3 murinos superexpressando o IGF-IR humano foram usados. Os camundongos com tumores estabelecidos de aproximadamente 180 mg foram tratados intraperitonealmente uma vez na semana, sete vezes, com 18, 6 ou 0,6 mg/kg do anticorpo 18. O tratamento foi iniciado com doses duplas do anticorpo dadas como dose inicial (36, 12 e 1,2 mg/kg). O experimento demonstra que por tratamento com o anticorpo, o crescimento do tumor pode ser retardado quando administrado com 18 e 6 mg/kg, uma vez na semana.

Exemplo 15

Indução de infra-regulação mediada por anticorpo do IGF-1R *in vitro*

[000161] De modo a detectar os efeitos do anticorpo da invenção sobre a quantidade do receptor de IGF-I (IGF-IR) em células tumorais, foram realizados experimentos em tempo-curso e subsequente análise de Western blotting com anticorpos específicos de IGF-IR.

[000162] Células tumorais humanas (HT29 5×10^4 células/mL) em meio RPMI 1640 (PAA, Cat. N° E15-039) suplementado com L-Glutamina a 2mM, 1 x de aminoácidos não essenciais (Gibco, Cat. N° 11140-035), piruvato de sódio a 1mM (Gibco, Cat. N° 11360-039) e 10% de FCS termoinativado (PAA, Cat. N° A15-771). Para cada período de incubação, uma placa com 12 cavidades foi inoculada com 1 mL de células no respectivo meio para cada experimento e cultivada por dois dias a 37°C e 5% de CO₂.

[000163] O meio foi cuidadosamente removido e substituído por concentrações diferentes de anticorpo diluído no meio respectivo. Em duas cavidades de controle, o meio foi substituído ou por meio sem anticorpo ou por meio com um anticorpo de controle (AB-1, Oncogene, Cat. N° GR11). As células foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ e placas individuais foram tiradas para posterior processamento depois de 15 minutos, 24 horas e 48 horas.

[000164] O meio foi cuidadosamente removido por aspiração e 100 µL de tampão de lise gelado foram adicionados por cavidade (Hepes a 50mM pH 7,2, NaCl a 150mM, EGTA a 1mM, 10% de glicerol, 1% de Triton[®] -X100, NaF a 100mM, Na₄P₂O₇ a 10mM, inibidor de protease Complete[®]). As células foram desprendidas usando um raspador de células (Corning Cat. N° 3010) e os conteúdos das cavidades transferidos para tubos de reação Eppendorf. Os fragmentos de células foram removidos por centrifugação por 10 minutos, a 13.000 rpm, e a 4°C e o sobrenadante foi adicionado a 2x tampão de amostra Laemmli em uma razão 1:1 (v/v). As proteínas celulares foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (PRO-

TRAN[®] BA 85, Schleicher&Schuell, Cat. N^o 10 401196) por Western blotting semi-seco.

[000165] Um anticorpo específico para IGF-IR (C-20, Santa Cruz Biotechnologies, Cat. N^o sc-713) foi usado para determinar os níveis de proteína de IGF-IR.

[000166] Foi observada infra-regulação de 50% ou mais do IGF-IR induzida pelo anticorpo da invenção depois de 24 horas após a adição do anticorpo.

TRATADO DE BUDAPESTE
SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNACIONAL DO DEPÓSITO DE MI-
CROORGANISMOS PARA FINS DE PROCESSAMENTO DE MATÉRIA DE
PATENTES

FORMATO INTERNACIONAL

DESTINATÁRIO:

Roche Diagnostics GmbH
Nonnenwald 2, D-82377 Penzberg
F. Hoffmann-La Roche AG
124 Grenzachstr., CH-4070 Basel
Hoffmann-La Roche Inc.
340 Kingsland Street, Nutley
NJ 07110-1199, USA

RECIBO NO CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL, emitido por força da regra 7.1 pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO identificada abaixo

I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO	
Referência de identificação fornecida pelo DEPOSITANTE: <IGP-1R. HUMAB-Clone 18	Número de acesso fornecido pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO: DSM ACC2587
II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA	
O microorganismo identificado acima (I) foi acompanhado por : <input type="checkbox"/> uma descrição científica <input type="checkbox"/> designação taxonômica proposta (marca com um X quando aplicável)	
III. RECIBO E ACEITAÇÃO	
A presente Autoridade Internacional de Depósito aceita o microorganismo identificado acima (I), o qual foi recebido em 10 DE ABRIL DE 2003 (data do depósito original) ¹	
IV. RECIBO DE REQUERIMENTO PARA CONVERSÃO	
O microorganismo identificado acima (I) foi recebido pela presente Autoridade Internacional de Depósito em (data do depósito original) e o requerimento para a conversão do depósito original em um depósito conforme tratado de Budapeste foi recebido em (data do recibo do requerimento para conversão)	
V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN gmbH	Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder de representação da Autoridade Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is) :
Endereço: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	
Data: 05 de maio de 2005	

¹ Quando aplicável a Regra 6.4 (d), a referida data é a data a qual o status na Autoridade Internacional de depósito foi obtido.

TRATADO DE BUDAPESTE
 SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNACIONAL DO DEPÓSITO DE MICRO-
 ORGANISMOS PARA FINS DE PROCESSAMENTO DE MATÉRIA DE PATENTES
 FORMATO INTERNACIONAL

DESTINATÁRIO:

Roche Diagnostics GmbH
Nonnenwald 2, D-82377 Penzberg
F. Hoffmann-La Roche AG
124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffmann-La Roche Inc.
340 Kingsland Street, Nutley
NJ 07110-1199, USA

RECIBO NO CASO DE DEPÓSITO ORI-
 GINAL, emitido por força da regra 10.2
 pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE
 DEPÓSITO identificada abaixo

I. DEPOSITANTE		II. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO	
Nome: Roche Diagnostics GmbH Nonnenwald 2, D-82377 Penzberg Endereço: F. Hoffmann-La Roche AG 124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel Hoffmann-La Roche Inc. 340 Kingsland Street, Nutley NJ 07110-1199, usa		Número de acesso fornecido pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO DSM ACC2587 Data do depósito ou da transferência ¹ : 10-04-2003	
III. DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE			
A Viabilidade do microorganismo identificado acima (II) foi testado em 10-04-2003 ² . Nessa data, o referido microorganismo foi <input checked="" type="checkbox"/> ³ viável <input type="checkbox"/> ³ inviável			
IV. CONDIÇÕES SOB AS QUAIS O TSTE DE VIABILIDADE É CONDUZIDA			
V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO			
Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Endereço : Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder de repre- sentação da autoridade Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is) Data: 05-03-2005	

¹ Indica a data de depósito original ou, quando um novo depósito ou transferência é feito, a data relevante mais recente (data do novo depósito ou data de transferência)

² Nos casos relacionados à Regra 10.2(a) (ii) e (iii), referem-se ao teste de viabilidade mais recente.

³ Marcar com um X o campo aplicável

⁴ Preencher se a informação for requerida e se os resultados do teste foram negativos

TRATADO DE BUDAPESTE
SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNACIONAL DO DEPÓSITO DE MICRO-
ORGANISMOS PARA FINS DE PROCESSAMENTO DE MATÉRIA DE PATENTES

FORMATO INTERNACIONAL

DESTINATÁRIO:

Roche Diagnostics GmbH
Nonnenwald 2, D-82377 Penzberg
F. Hoffmann-La Roche AG
124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffmann-La Roche Inc.
9340 Kingsland Street, Nutley
NJ 07110-1199, USA

RECIBO NO CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL, emitido por força da regra 7.1 pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO identificada abaixo

I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO	
Referência de identificação fornecida pelo DEPOSITANTE: <IGP-1R> hUMAB-Clone 22	Número de acesso fornecido pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO: DSM ACC2594
II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA	
O microorganismo identificado acima (I) foi acompanhado por : <input type="checkbox"/> uma descrição científica <input type="checkbox"/> designação taxonômica proposta (marca com um X quando aplicável)	
III. RECIBO E ACEITAÇÃO	
A presente Autoridade Internacional de Depósito aceita o microorganismo identificado acima (I), o qual foi recebido em 09 DE MAIO DE 2003 (data do depósito original) ¹	
IV. RECIBO DE REQUERIMENTO PARA CONVERSÃO	
O microorganismo identificado acima (I) foi recebido pela presente Autoridade Internacional de Depósito em (data do depósito original) e o requerimento para a conversão do depósito original em um depósito conforme tratado de Budapeste foi recebido em (data do recibo do requerimento para conversão)	
V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN gmbH	Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder de representação da Autoridade Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is) :
Endereço: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	
Data: 21 de maio de 2003	

¹ Quando aplicável a Regra 6.4 (d), a referida data é a data a qual o status na Autoridade Internacional de depósito foi obtido.

TRATADO DE BUDAPESTE
 SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNACIONAL DO DEPÓSITO DE MICRO-
 ORGANISMOS PARA FINS DE PROCESSAMENTO DE MATÉRIA DE PATENTES
 FORMATO INTERNACIONAL

DESTINATÁRIO:

Roche Diagnostics GmbH
Nonnenwald 2, D-82377 Penzberg
F. Hoffmann-La Roche AG
124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffmann-La Roche Inc.
9340 Kingsland Street, Nutley
NJ 07110-1199, USA

RECIBO NO CASO DE DEPÓSITO
 ORIGINAL, emitido por força da regra
 10.2 pela AUTORIDADE INTERNACIONAL
 DE DEPÓSITO identificada abaixo

I. DEPOSITANTE		II. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO	
Nome: Roche Diagnostics GmbH Nonnenwald 2, D-82377 Penzberg Endereço: F. Hoffmann-La Roche AG 124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel Hoffmann-La Roche Inc. 340 Kingsland Street, Nutley NJ 07110-1199, usa		Número de acesso fornecido pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO DSM ACC2594 Data do depósito ou da transferência ¹ : 09-05-2003	
III. DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE			
A Viabilidade do microorganismo identificado acima (II) foi testado em 12-05-2003 ² . Nessa data, o referido microorganismo foi <input checked="" type="checkbox"/> ³ viável <input type="checkbox"/> ³ inviável			
IV. CONDIÇÕES SOB AS QUAIS O TSTE DE VIABILIDADE É CONDUZIDA			
V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO			
Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Endereço : Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder de repre- sentação da autoridade Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is) Data: 21-05-2003	

¹ Indica a data de depósito original ou, quando um novo depósito ou transferência é feito, a data relevante mais recente (data do novo depósito ou data de transferência)

² Nos casos relacionados à Regra 10.2(a) (ii) e (iii), referem-se ao teste de viabilidade mais recente.

³ Marcar com um X o campo aplicável

⁴ Preencher se a informação for requerida e se os resultados do teste foram negativos

TRATADO DE BUDAPESTE
SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNACIONAL DO DEPÓSITO DE MICRO-
ORGANISMOS PARA FINS DE PROCESSAMENTO DE MATÉRIA DE PATENTES

FORMATO INTERNACIONAL

DESTINATÁRIO:

Roche Diagnostics GmbH
Nonnenwald 2, D-82377 Penzberg
F. Hoffmann-La Roche AG
124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffmann-La Roche Inc.
340 Kingsland Street, Nutley
NJ 07110-1199, USA

RECIBO NO CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL, emitido por força da regra 7.1 pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO identificada abaixo

I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO	
Referência de identificação fornecida pelo DEPOSITANTE:	Número de acesso fornecido pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:
<IGP-1R. HUMAB-Clone 1a	DSM ACC2586
II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA	
O microorganismo identificado acima (I) foi acompanhado por : <input type="checkbox"/> uma descrição científica <input type="checkbox"/> designação taxonômica proposta (marca com um X quando aplicável)	
III. RECIBO E ACEITAÇÃO	
A presente Autoridade Internacional de Depósito aceita o microorganismo identificado acima (I), o qual foi recebido em 10 DE ABRIL DE 2003 (data do depósito original) ¹	
IV. RECIBO DE REQUERIMENTO PARA CONVERSÃO	
O microorganismo identificado acima (I) foi recebido pela presente Autoridade Internacional de Depósito em _____ (data do depósito original) e o requerimento para a conversão do depósito original em um depósito conforme tratado de Budapeste foi recebido em _____ (data do recibo do requerimento para conversão)	
V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN gmbH	Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder de representação da Autoridade Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is) :
Endereço: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	
Data: 05 de maio de 2003	

¹ Quando aplicável a Regra 6.4 (d), a referida data é a data a qual o status na Autoridade Internacional de depósito foi obtido.

TRATADO DE BUDAPESTE
 SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNACIONAL DO DEPÓSITO DE MICRO-
 ORGANISMOS PARA FINS DE PROCESSAMENTO DE MATÉRIA DE PATENTES
 FORMATO INTERNACIONAL

DESTINATÁRIO:

Roche Diagnostics GmbH
Nonnenwald 2, D-82377 Penzberg
F. Hoffmann-La Roche AG
124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffmann-La Roche Inc.
340 Kingsland Street, Nutley
NJ 07110-1199, USA

RECIBO NO CASO DE DEPÓSITO
 ORIGINAL, emitido por força da regra
 10.2 pela AUTORIDADE INTERNACIONAL
 DE DEPÓSITO identificada abaixo

I. DEPOSITANTE		II. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO	
Nome: Roche Diagnostics GmbH Nonnenwald 2, D-82377 Penzberg Endereço: F. Hoffmann-La Roche AG 124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel Hoffmann-La Roche Inc. 340 Kingsland Street, Nutley NJ 07110-1199, usa		Número de acesso fornecido pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO DSM ACC2586 Data do depósito ou da transferência ¹ : 10-04-2003	
III. DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE			
A Viabilidade do microorganismo identificado acima (II) foi testado em 10-04-2003 ² . Nessa data, o referido microorganismo foi <input checked="" type="checkbox"/> ³ viável <input type="checkbox"/> ³ inviável			
IV. CONDIÇÕES SOB AS QUAIS O TSTE DE VIABILIDADE É CONDUZIDA			
V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO			
Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Endereço : Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder de repre- sentação da autoridade Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is) Data: 05-05-2003	

¹ Indica a data de depósito original ou, quando um novo depósito ou transferência é feito, a data relevante mais recente (data do novo depósito ou data de transferência)

² Nos casos relacionados à Regra 10.2(a) (ii) e (iii), referem-se ao teste de viabilidade mais recente.

³ Marcar com um X o campo aplicável

⁴ Preencher se a informação for requerida e se os resultados do teste foram negativos

TRATADO DE BUDAPESTE
SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNACIONAL DO DEPÓSITO DE MICRO-
ORGANISMOS PARA FINS DE PROCESSAMENTO DE MATÉRIA DE PATENTES

FORMATO INTERNACIONAL

DESTINATÁRIO:

Roche Diagnostics GmbH
Nonnenwald 2, D-82377 Penzberg
F. Hoffmann-La Roche AG
124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffmann-La Roche Inc.
340 Kingsland Street, Nutley
NJ 07110-1199, USA

RECIBO NO CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL, emitido por força da regra 7.1 pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO identificada abaixo

I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO	
Referência de identificação fornecida pelo DEPOSITANTE:	Número de acesso fornecido pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:
<IGP-1R> HUMAB-Clone 23	DSM ACC2588
II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA	
<p>O microorganismo identificado acima (I) foi acompanhado por :</p> <p style="padding-left: 20px;"><input type="checkbox"/> uma descrição científica</p> <p style="padding-left: 20px;"><input type="checkbox"/> designação taxonômica proposta</p> <p>(marca com um X quando aplicável)</p>	
III. RECIBO E ACEITAÇÃO	
A presente Autoridade Internacional de Depósito aceita o microorganismo identificado acima (I), o qual foi recebido em 10 DE ABRIL DE 2003 (data do depósito original) ¹	
IV. RECIBO DE REQUERIMENTO PARA CONVERSÃO	
<p>O microorganismo identificado acima (I) foi recebido pela presente Autoridade Internacional de Depósito em _____ (data do depósito original)</p> <p>e o requerimento para a conversão do depósito original em um depósito conforme tratado de Budapeste foi recebido em _____ (data do recibo do requerimento para conversão)</p>	
V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
<p>Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN gmbH</p> <p>Endereço: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</p>	<p>Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder de representação da Autoridade Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is) :</p> <p style="text-align: right;">Data: 05 de maio de 2003</p>

¹ Quando aplicável a Regra 6.4 (d), a referida data é a data a qual o status na Autoridade Internacional de depósito foi obtido.

TRATADO DE BUDAPESTE
 SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNACIONAL DO DEPÓSITO DE MICRO-
 ORGANISMOS PARA FINS DE PROCESSAMENTO DE MATÉRIA DE PATENTES
 FORMATO INTERNACIONAL

DESTINATÁRIO:

Roche Diagnostics GmbH
Nonnenwald 2, D-82377 Penzberg
F. Hoffmann-La Roche AG
124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffmann-La Roche Inc.
340 Kingsland Street, Nutley
NJ 07110-1199, USA

RECIBO NO CASO DE DEPÓSITO
 ORIGINAL, emitido por força da regra
 10.2 pela AUTORIDADE INTERNACIONAL
 DE DEPÓSITO identificada abaixo

I. DEPOSITANTE		II. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO	
Nome: Roche Diagnostics GmbH Nonnenwald 2, D-82377 Penzberg Endereço: F. Hoffmann-La Roche AG 124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel Hoffmann-La Roche Inc. 340 Kingsland Street, Nutley NJ 07110-1199, usa		Número de acesso fornecido pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO DSM ACC2588 Data do depósito ou da transferência ¹ : 10-04-2003	
III. DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE			
A Viabilidade do microorganismo identificado acima (II) foi testado em 10-04-2003 ² . Nessa data, o referido microorganismo foi <input checked="" type="checkbox"/> ³ viável <input type="checkbox"/> ³ inviável			
IV. CONDIÇÕES SOB AS QUAIS O TSTE DE VIABILIDADE É CONDUZIDA			
V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO			
Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Endereço : Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder de repre- sentação da autoridade Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is) Data: 05-05-2003	

¹ Indica a data de depósito original ou, quando um novo depósito ou transferência é feito, a data relevante mais recente (data do novo depósito ou data de transferência)

² Nos casos relacionados à Regra 10.2(a) (ii) e (iii), referem-se ao teste de viabilidade mais recente.

³ Marcar com um X o campo aplicável

⁴ Preencher se a informação for requerida e se os resultados do teste foram negativos

TRATADO DE BUDAPESTE
SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNACIONAL DO DEPÓSITO DE MICRO-
ORGANISMOS PARA FINS DE PROCESSAMENTO DE MATÉRIA DE PATENTES

FORMATO INTERNACIONAL

DESTINATÁRIO:

Roche Diagnostics GmbH
Nonnenwald 2, D-82377 Penzberg
F. Hoffmann-La Roche AG
124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffmann-La Roche Inc.
340 Kingsland Street, Nutley
NJ 07110-1199, USA

RECIBO NO CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL, emitido por força da regra 7.1 pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO identificada abaixo

I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO	
Referência de identificação fornecida pelo DEPOSITANTE:	Número de acesso fornecido pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:
<IGP-1R> HUMAB-Clone 8	DSM ACC2589
II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA	
O microorganismo identificado acima (I) foi acompanhado por : <input type="checkbox"/> uma descrição científica <input type="checkbox"/> designação taxonômica proposta (marca com um X quando aplicável)	
III. RECIBO E ACEITAÇÃO	
A presente Autoridade Internacional de Depósito aceita o microorganismo identificado acima (I), o qual foi recebido em 24 DE ABRIL DE 2003 (data do depósito original) ¹	
IV. RECIBO DE REQUERIMENTO PARA CONVERSÃO	
O microorganismo identificado acima (I) foi recebido pela presente Autoridade Internacional de Depósito em _____ (data do depósito original) e o requerimento para a conversão do depósito original em um depósito conforme tratado de Budapeste foi recebido em _____ (data do recibo do requerimento para conversão)	
V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN gmbH	Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder de representação da Autoridade Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is) :
Endereço: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	
Data: 07 de maio de 2003	

¹ Quando aplicável a Regra 6.4 (d), a referida data é a data a qual o status na Autoridade Internacional de depósito foi obtido.

TRATADO DE BUDAPESTE
 SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNACIONAL DO DEPÓSITO DE MICRO-
 ORGANISMOS PARA FINS DE PROCESSAMENTO DE MATÉRIA DE PATENTES
 FORMATO INTERNACIONAL

DESTINATÁRIO:

Roche Diagnostics GmbH
Nonnenwald 2, D-82377 Penzberg
F. Hoffmann-La Roche AG
124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffmann-La Roche Inc.
340 Kingsland Street, Nutley
NJ 07110-1199, USA

RECIBO NO CASO DE DEPÓSITO
 ORIGINAL, emitido por força da regra
 10.2 pela AUTORIDADE INTERNACIONAL
 DE DEPÓSITO identificada abaixo

I. DEPOSITANTE		II. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO	
Nome: Roche Diagnostics GmbH Nonnenwald 2, D-82377 Penzberg Endereço: F. Hoffmann-La Roche AG 124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel Hoffmann-La Roche Inc. 340 Kingsland Street, Nutley NJ 07110-1199, usa		Número de acesso fornecido pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO DSM ACC2589 Data do depósito ou da transferência ¹ : 24-04-2003	
III. DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE			
A Viabilidade do microorganismo identificado acima (II) foi testado em 28-04-2003 ² . Nessa data, o referido microorganismo foi <input checked="" type="checkbox"/> ³ viável <input type="checkbox"/> ³ inviável			
IV. CONDIÇÕES SOB AS QUAIS O TSTE DE VIABILIDADE É CONDUZIDA			
V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO			
Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Endereço : Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder de repre- sentação da autoridade Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is) Data: 07-05-2003	

¹ Indica a data de depósito original ou, quando um novo depósito ou transferência é feito, a data relevante mais recente (data do novo depósito ou data de transferência)

² Nos casos relacionados à Regra 10.2(a) (ii) e (iii), referem-se ao teste de viabilidade mais recente.

³ Marcar com um X o campo aplicável

⁴ Preencher se a informação for requerida e se os resultados do teste foram negativos

TRATADO DE BUDAPESTE
SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNACIONAL DO DEPÓSITO DE MICRO-
ORGANISMOS PARA FINS DE PROCESSAMENTO DE MATÉRIA DE PATENTES

FORMATO INTERNACIONAL

DESTINATÁRIO:

Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Str. 116, D-68305 Mannheim
F. Hoffmann-La Roche AG
124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffmann-La Roche Inc.
340 Kingsland Street, Nutley
NJ 07110-1199, USA

RECIBO NO CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL, emitido por força da regra 7.1 pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO identificada abaixo

I. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO	
Referência de identificação fornecida pelo DEPOSITANTE:	Número de acesso fornecido pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO:
hu Mab<IGF-1R>B1-4E10_9-16	DSM ACC2795
II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA	
O microorganismo identificado acima (I) foi acompanhado por : (X) uma descrição científica () designação taxonômica proposta (marca com um X quando aplicável)	
III. RECIBO E ACEITAÇÃO	
A presente Autoridade Internacional de Depósito aceita o microorganismo identificado acima (I), o qual foi recebido em 21 DE JUNHO DE 2006 (data do depósito original) ¹	
IV. RECIBO DE REQUERIMENTO PARA CONVERSÃO	
O microorganismo identificado acima (I) foi recebido pela presente Autoridade Internacional de Depósito em _____ (data do depósito original) e o requerimento para a conversão do depósito original em um depósito conforme tratado de Budapeste foi recebido em _____ (data do recibo do requerimento para conversão)	
V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN gmbH	Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder de representação da Autoridade Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is) :
Endereço: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	
Data: 28 de junho de 2003	

¹ Quando aplicável a Regra 6.4 (d), a referida data é a data a qual o status na Autoridade Internacional de depósito foi obtido.

TRATADO DE BUDAPESTE
 SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNACIONAL DO DEPÓSITO DE MICRO-
 ORGANISMOS PARA FINS DE PROCESSAMENTO DE MATÉRIA DE PATENTES
 FORMATO INTERNACIONAL

DESTINATÁRIO:

Roche Diagnostics GmbH
Nonnenwald 2, D-82377 Penzberg
F. Hoffmann-La Roche AG
124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel
Hoffmann-La Roche Inc.
340 Kingsland Street, Nutley
NJ 07110-1199, USA

RECIBO NO CASO DE DEPÓSITO
 ORIGINAL, emitido por força da regra
 10.2 pela AUTORIDADE INTERNACIONAL
 DE DEPÓSITO identificada abaixo

I. DEPOSITANTE		II. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO	
Nome: Roche Diagnostics GmbH Nonnenwald 2, D-82377 Penzberg Endereço: F. Hoffmann-La Roche AG 124 Grenzacherstr., CH-4070 Basel Hoffmann-La Roche Inc. 340 Kingsland Street, Nutley NJ 07110-1199, usa		Número de acesso fornecido pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO DSM ACC2795 Data do depósito ou da transferência ¹ : 21-06-2006	
III. DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE			
A Viabilidade do microorganismo identificado acima (II) foi testado em 21-06-2006 ² . Nessa data, o referido microorganismo foi <input checked="" type="checkbox"/> ³ viável <input type="checkbox"/> ³ inviável			
IV. CONDIÇÕES SOB AS QUAIS O TSTE DE VIABILIDADE É CONDUZIDA			
V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO			
Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Endereço : Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder de repre- sentação da autoridade Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is) Data: 28-06-2006	

¹ Indica a data de depósito original ou, quando um novo depósito ou transferência é feito, a data relevante mais recente (data do novo depósito ou data de transferência)

² Nos casos relacionados à Regra 10.2(a) (ii) e (iii), referem-se ao teste de viabilidade mais recente.

³ Marcar com um X o campo aplicável

⁴ Preencher se a informação for requerida e se os resultados do teste foram negativos

REIVINDICAÇÃO

1. Anticorpo que se liga ao IGF-IR, sendo do tipo IgG1 ou IgG3 humana e sendo glicosilado com uma cadeia de açúcar em Asn297, o referido anticorpo sendo caracterizado pelo fato de que é produzido pela linhagem celular recombinante depositada sob o número de acesso DSM ACC 2795.

