



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE N°

06-2778

54. TÍTULO "ANTICUERPOS CONTRA EL RECEPTOR I DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE TIPO
INSULINICO Y USOS DE LOS MISMOS"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C12N 15/13, 5/16, A61K 39/395, 39/4A, A61P35/00

71. SOLICITANTE F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

DOMICILIO BASILEA, SUIZA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P.53.215

22. BOGOTÁ, D.C. 13 ENE. 2005

OK

SS

PETITORIO



SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
 Radicación : 06002778 00000000 Folios: 181
 Fecha (MD): 2006-01-13 17:21:12
 Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
 Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL 2006-02-10

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Capítulo I.

☒ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

Dirección: Grenzacherstrasse 124
 CH-4070 Basilea, Suiza

Nacionalidad o Domicilio: Basilea, Suiza.

Lugar de Constitución: Suiza.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
 C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALICIA LLOREDICA RICAURTE

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
 Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐
 C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: GRAUS, Yvo; KOPETZKI, Erhard; KUENKELE, Klaus-Peter;
 MUNDIGL, Olaf; PARREN, Paul; REBERS, Frank; SCHUMACHER, Ralf; VAN
 DE WINKEL, Jan y VAN VUGT, Martine.

Dirección: Werdorperwaard 3, NL-3984 PR Odijk; Kastnerhofstr. 21, 82377
 Penzberg; Karwendelstrasse 9, 83671 Benediktbeuern; Tassiloring 16, 82362
 Weilheim; Werdorperwaard 17, NL-3984 PR Odijk; Adriaan Menninckkwartier 34,
 NL-3554 CT Utrecht; Hochfeldstrasse 78, 82377 Penzberg; Verlengde Slotlaan
 80, NL-3707 CK Zelst; Fluweelmos 6, NL-3984 KR Houten.

Nacionalidad o Domicilio: Holanda y Alemania.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2004/007582 ✓

Fecha: 09/07/04 ✓

Publicación Internacional No. WO 2005/005635 A2 ✓

Fecha: 20/01/05 ✓

⑥

Título (54) "ANTICUERPOS CONTRA EL RECEPTOR I DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE
 TIPO INSULINICO Y USOS DE LOS MISMOS"

⑦

Clasificación Internacional (51) C12N 15/13, C12N 5/16, A61K 39/395, A61K 39/4A, A61P35k

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

EP

10/07/03

03015528.1

⑨

Comprobante de Pago No. 06-691

Fecha: 04-01-06

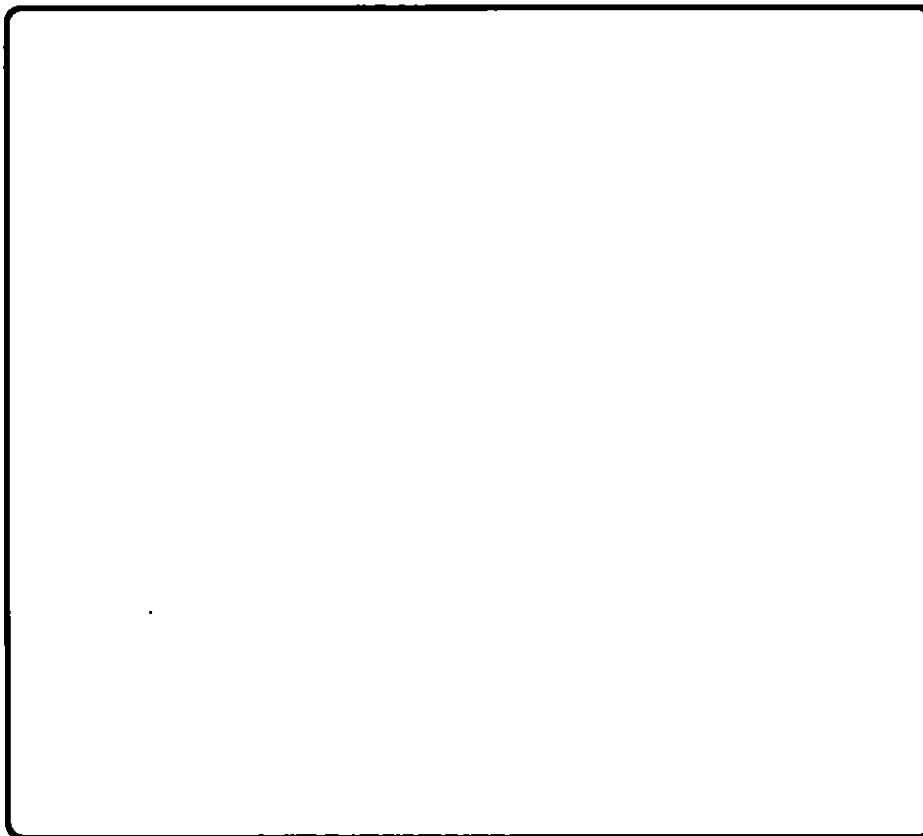
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☒ Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional con su traducción, Publicación con su traducción, Notificación del registro de cambio de Dirección del Inventor GRAUS, Yvo, Notificación del registro de cambio de Nombre del Inventor VAN VUGT, Martine con su traducción, Indicaciones relacionadas con la solución pericial con respecto al material biológico depositado al que se refiere la descripción con su traducción, Indicaciones relacionadas con microorganismos depositados u otro material biológico Regla 13bis del PCT con su traducción y Listado de Secuencias.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713

T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 06002778 00000000 folios: 161
N Fecha (MM): 2006-01-13 17:31:12
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 691
FECHA : ENERO 4 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	47045867	04/01/2006	5,926,500.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
	TOTAL :	\$ 463,000.00

SOM: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____



RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se esta presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.



ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No.

de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello de la traductora, lo mismo que la presente.-

Traducción de la apostilla en inglés que se encuentra a continuación de la legalización de las firmas de los señores Klausner y Strebel, representantes legales de F. Hoffmann-La Roche, que aparecen en un documento de Poder, escrito en español e inglés, conferido a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, expedida en idioma inglés por el notario Peter Kuster, bajo el No. 2004/20, el 17-08-2004, en Basilea, Suiza.

AUTENTICACION OFICIAL

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Suiza

Este documento público

2. Ha sido firmado por el Lic. iur. Peter Kuster

3. Actuando en calidad de notario público

4. Lleva el sello del mencionado notario

Certificado

5. en Basel (Basilea)

6. el 18 de agosto 2004

7. por la Cancillería de Estado del Cantón de Basel-Stadt

8. bajo el No 8835/13376

9. Sello

Cancillería de Estado

de la ciudad de Basel (Basilea)

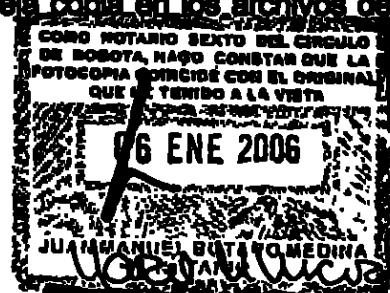
10. Firma

Fdo.: firma ilegible

Ruedi Eggs

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los archivos de estas oficinas para su confrontación.

Bogotá, 2 de septiembre 2004



Maria Mercedes Uricoechea T.

Traductora Juramentada

Resolución 10607/81 Minjusticia

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

250651

Mano Uncochea

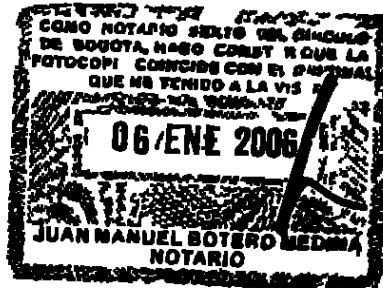
COTIA FIRMA APARETE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

BO DE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 SET - 3 P 12: 12

UCS

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.



5
abajo firmados, F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Suiza.

con domicilio en 4070 Basilea, Suiza

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 8o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias; y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

The undersigned, F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, a corporation organized and existing under the laws of Switzerland.

domiciled at 4070 Basel, Switzerland

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good on all parts said representatives and/or the agents empowered to them appointed may do for our benefit.

We also authorize ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this 17th day of August 2008.
F. Hoffmann-La Roche AG


Fridolin Klausner
Holder of procuration


Denise Sträbel
Mandatory

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

6

Sulza
Basilea

(ss)

Hoy 17 de Agosto de 2004, compareció Fridolin Klausner y Denise Strebel a quien conozco y de quien se consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es titular del poder/mo ndatario de F.H. HOFFMANN-LA ROCHE AG, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de Sulza, domiciliada en la ciudad de Basilea, Sulza, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce el objeto social; conforme a las leyes de Sulza; que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este Instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de Incorporación firmados en Sulza, ciudad de Basilea, con fecha 19 Junio 1997, y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

Switzerland
Basel

(ss)

On this 17th day of August 2004 personally, Fridolin Klausner and Denise Strebel came both, Swiss citizens and Swiss residents, to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the Holder of Procuration/Mandatory of F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the Switzerland, domiciled at the City of Basel, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of Switzerland; that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this Instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at Sulza, ciudad de Basel, under date of 19th day of June 1997, and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.

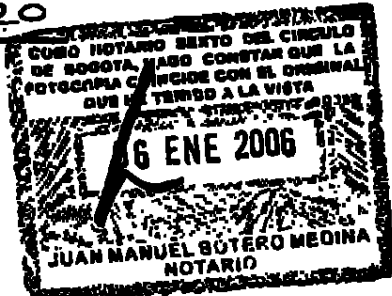
Basel, this 17-08-2004 (seventeenth day of two thousand and four)

D. P. Kuster
Notar



Allg. Prot. ... No. 20

Dr. Peter Kuster
Advokat und Notar
Peterskirchplatz 12
Postfach
CH-4001 Basel



6

OFFICIAL AUTHENTICATION
(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz/Suisse)

This official document

2. is signed by *P. J. J. J.*

3. in his/her function as *Chancery*

4. and certified by the seal of the *Chancery*

Certified, **18. Aug. 2004**

5. in Basel (Bâle)

6. on *18. Aug. 2004*

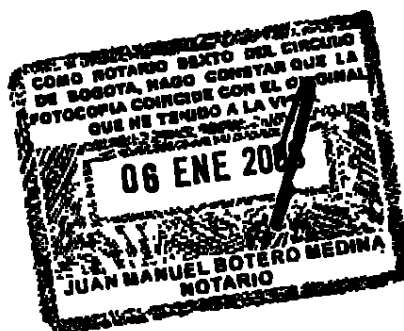
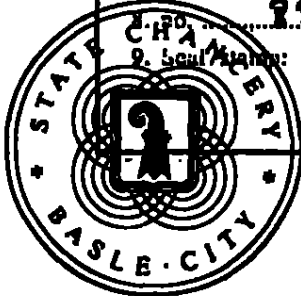
7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt

8. No. *1115/11 226*

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

[Signature]
Hans Eggli



RETIRAR FOLIO 7 PARA PUBLICACIÓN.
RETIRAR FOLIOS 8 Y 9 PARA TARJETERO.

7

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES PCT REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Registro de referencia del solicitante o agente 21695 WO-SR	PARA FUTURAS ACCIONES ver Notificación o Transmisión del Reporte de Búsqueda Internacional (Forma PCT/ISA/220) así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación.	
Solicitud internacional No. PCT/EP2004/007562	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 09/07/2004	Fecha de Prioridad (Primera) (día/mes/año) 10/07/2003
Solicitante F. HOFFMANN-LA ROCHE AG		

Este Reporte de Búsqueda Internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante Según el Artículo 18. Una copia será transmitida a la Oficina Internacional.

Este Reporte de Búsqueda Internacional consta de un total de 10 hojas.

☒ También está acompañado de una copia de cada documento técnico anterior citado en este reporte.

1. Bases del reporte

a. Respecto al lenguaje, la búsqueda internacional se llevó a cabo según la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó, a menos que se indique de otro modo en este ítem.

☐ la búsqueda internacional se llevó a cabo según la traducción de la solicitud internacional proporcionada a esta Autoridad (Regla 23.1(b)).

b. ☒ Respecto a una secuencia de ácido nucleotídico y/o amino revelado en la solicitud internacional, ver Casilla No. 1.

2. ☒ Ciertas reivindicaciones no pudieron localizarse (Ver Casilla II).

3. ☒ Falta unidad de invención (ver Casilla III).

4. Respecto al título,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido que el texto se lee así:

5. Respecto al resumen,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Norma 38.2(b), según aparece en el Recuadro III. El solicitante puede, un mes después de la fecha de haber enviado por correo este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad.

6. Respecto a los dibujos,

a. La figura de los dibujos que se publicará con el resumen es la Figura No. _____

☐ como lo sugirió el solicitante.

☐ porque el solicitante no sugirió una figura.

☐ porque esta figura caracteriza mejor a la invención.

b. ☒ Ninguna de las figuras se publicará con el resumen.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.

PCT/EP2004/007562

Casilla No. I. Nucleótido y/o secuencia(s) aminoácida(s) (Continuación del ítem 1.b de la primera hoja)

1. Respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia aminoácida revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido según:

a. tipo de material:

- ☒ un listado de secuencia
☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia

b. formato de material:

- ☒ en formato escrito
☒ en formato legible por computador

c. tiempo de presentación/suministro:

- ☒ contenido en la solicitud internacional según se registró
☒ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador
☐ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda.

2. ☐ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.

3. Comentarios adicionales:

Casilla II Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del Item 2 de la primera hoja)

Este reporte de búsqueda internacional no ha sido establecido respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☒ Reivindicaciones Nos.:

porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber:

Aunque las reivindicaciones 16-17 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal (Artículo 52(4) EPC), la búsqueda se ha llevado a cabo y con base en los efectos supuestos del compuesto/composición.

2. ☒ Reivindicaciones Nos.:

porque se relacionan con partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente:

ver INFORMACION ADICIONAL página PCT/ISA/210

3. ☐ Reivindicaciones No.:

porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Norma 6.4(a).

Casilla III Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del Item 3 de la primera hoja)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, así:

Ver página adicional

1. ☒ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.

2. ☐ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales.

3. ☐ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos.:

4. ☐ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos. Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos.:

Comentario sobre Protesta

☐ Los derechos de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante.

☒ El pago de los derechos de búsqueda adicionales no estuvo acompañado por una protesta.

INFORMACION ADICIONAL CONTINUADA DE PCT/ISA/ 210

Continuación de la Casilla II.1

Aunque las reivindicaciones 16-17 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal (Artículo 52(4) EPC), se ha realizado la búsqueda y se ha basado en los presuntos efectos del compuesto/composición.

Continuación de la Casilla II.1

La Regla 39.1(iv) PCT – Método para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia

Continuación de la Casilla II.2

Reivindicaciones No. :

Las presentes reivindicaciones 1-5 están relacionadas con un anticuerpo definido por referencia a una característica o propiedad deseable, a saber:

- relación de valores IC50 o inhibición de 1:3 a 3:1,
- Inhibe por al menos 80% a una concentración de fosforilación IGF-IR 5 nM,
- no muestra actividad estimulada por IGF-IR,
- Induce la muerte celular del 20%,
- anticuerpo humano o humanizado
- Kd de aproximadamente 10e-13 a 10e-9 M.

Las reivindicaciones cubren todos los productos que tienen esta característica o propiedad, mientras que la solicitud provee soporte dentro del significado del Artículo 84 EPC y/o revelación dentro del significado del Artículo 83 EPC para solamente un número muy limitado de tales productos. En el caso presente, las reivindicaciones carecen tanto de soporte, y la solicitud carece tanto de revelación, que es imposible una búsqueda significativa sobre el alcance total reivindicado. Independientemente del razonamiento anterior, las reivindicaciones también carecen de claridad (Artículo 84 EPC). Se hace un intento para definir el producto por la referencia a un resultado a ser alcanzado. De nuevo, esta falta de claridad en el caso presente es tal que hace imposible una búsqueda significativa sobre el alcance total reivindicado. En consecuencia, se ha realizado la búsqueda para aquellas partes de las reivindicaciones que parecen estar claras, soportadas y reveladas, a saber la reivindicación 6.

Se llama la atención del solicitante al hecho que las reivindicaciones que relacionan invenciones con respecto de las cuales no se ha establecido reporte de búsqueda internacional, no necesitan estar sujetas a un examen preliminar internacional (Regla 66.1(e) PCT). Se le advierte al solicitante que la política de la EPO cuando actúa como una Autoridad Examinadora Preliminar Internacional, no es normalmente realizar un examen preliminar sobre la materia que no ha sido buscada. Este es el caso independientemente de si las reivindicaciones están o no enmendadas después de la recepción del reporte de búsqueda o durante cualquier procedimiento del Capítulo II. Si el solicitante procede a la fase regional antes de la EPO, se le

INFORMACION ADICIONAL CONTINUADA DE PCT/ISA/ 210
recuerda al solicitante que se puede realizar una búsqueda durante el examen antes del EPO (Ver Guías de EPO C-VI, 8.5), si se superan los problemas que conducen a la declaración del Artículo 17(2).

INFORMACION ADICIONAL CONTINUADA DE PCT/ISA/ 210

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró múltiples (grupos de) invenciones en esta solicitud internacional, como sigue:

1. Reivindicaciones: 1-17, 19

Un anticuerpo que se enlaza a IGF-IR y que inhibe el enlace de IGF-I e IGF-II a IGF-IR con las características de la reivindicación 1.

2. Reivindicación 18

Un método para la selección de un anticuerpo contra IGF-IR que no tiene propiedad agonística.

13 **REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2004/007562

A. CLASIFICACION DE MATERIA

IPC 7 C12N15/13 C12N5/16 A61K39/395

Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)

IPC 7 C07K A61K G01N

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

EPO-Interno, PAJ, WPI Dato, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Dato, Búsqueda de Secuencia

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	WO 02/053596 A (GALLO MICHAEL; MILLER PENELOPE E (US); ABGENIX INC (US); COHEN BRU) 11 de Julio de 2002 (2002-07-11) citado en la solicitud el documento completo	1-17, 19
X	ROHLIK QTAND AL.: "Un anticuerpo al receptor para el factor de crecimiento I tipo insulínico que inhibe el crecimiento de células mcf-7 en cultivos de tejido" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 149, no. 1, 1987, páginas 276-281, XP008026319 citado en la solicitud el documento completo — —/—	1-17, 19

☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.

☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular

'B' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)

'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios

'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención

'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica

'Z' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional

23 de Marzo de 2005

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

17.06.2005

Nombre y dirección de correo de ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040 Tx 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Vadot, P

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2004/007562

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	LI S-L ET AL: "ANTICUERPOS DE CADENA SENCILLA CONTRA EL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO HUMANO I TIPO INSULINICO: EXPRESION, PURIFICACION Y EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE TUMOR" CANCER IMMUNOLOGY AND IMMUNOTHERAPY, BERLIN, DE, vol. 49, no. 4/5, Julio de 2000 (2000-07), páginas 243-252, XP001113064 ISSN: 0340-7004 el documento completo	1-17, 19
P,X	WO 03/100008 A (BRAMS PETER; HAILEY JUDITH (US); SCHERING CORP (US); FEINGERSH DIA) 4 de Diciembre de 2003 (2003-12-04) reivindicaciones	1-17, 19
P,X	WO 03/059951 A (LEGER OLIVIER; PF MEDICAMENT (FR); GOETSCH LILIANE (FR), CORVAIA N) 24 de Julio de 2003 (2003-07-24) reivindicaciones	1-17, 19
X	LI SHU-LIAN ET AL. : "Anticuerpos de cadena sencilla contra el receptor del factor de crecimiento humano I tipo insulínico: expresión, purificación y efecto sobre el crecimiento de tumor" CANCER IMMUNOL. IMMUNOTHER., vol. 49, 2000, páginas 243-252, XP002267730 resumen	1-17, 19
X	HAILEY J. ET AL.: "Neutralización de anticuerpos del receptor 1 del factor de crecimiento tipo anti-insulínico que inhiben la función de receptor e inducen la degradación del receptor en células de tumor" MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, vol. 1, 2002, páginas 1349-1353, XP008026465 resumen	1-17, 19
A	WO 95/14930 A (GENENTECH, INC; GODOWSKI, PAUL, J; MARK, MELANIE, R; SADIK, MICHAEL,) 1 de Junio de 1995 (1995-06-01)	

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
Informe sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2004/007562

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda		Fecha de publicación		Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 02053596	A	11-07-2002	CA	2433800 A1	11-07-2002
			CZ	20032131 A3	14-01-2004
			EE	200300318 A	15-10-2003
			EP	1399483 A2	24-03-2004
			HU	0302525 A2	28-10-2003
			JP	2004531217 T	14-10-2004
			NO	20033074 A	04-07-2003
			SK	9932003 A3	08-06-2004
			WO	02053596 A2	11-07-2002
			US	2004086503 A1	06-05-2004
			ZA	200305995 A	04-08-2004
WO 03100008	A	04-12-2003	AU	2003241590 A1	12-12-2003
			CA	2404000 A1	04-12-2003
			EP	1506286 A2	16-02-2005
			WO	03100008 A2	04-12-2003
			US	2004018191 A1	29-01-2004
WO 03059951	A	24-07-2003	FR	2834990 A1	25-07-2003
			FR	2834900 A1	25-07-2003
			FR	2834991 A1	25-07-2003
			AU	2003216748 A1	30-07-2003
			BR	0306973 A	09-11-2004
			CA	2473039 A1	24-07-2003
			EP	1461359 A2	29-09-2004
			WO	03059951 A2	24-07-2003
WO 9514930	A	01-06-1995	US	6001621 A	14-12-1999
			AT	163231 T	15-02-1998
			AU	697142 B2	01-10-1998
			AU	1100095 A	13-06-1995
			AU	698975 B2	12-11-1998
			AU	1210095 A	13-06-1995
			CA	2175892 A1	01-06-1995
			CA	2175893 A1	01-06-1995
			DE	69408541 D1	19-03-1998
			DE	69408541 T2	06-08-1998
			DK	730740 T3	28-09-1998
			EP	0730646 A1	11-09-1996
			EP	0730740 A1	11-09-1996
			ES	2116066 T3	01-07-1998
			GR	3026430 T3	30-06-1998
			HK	1008440 A1	07-05-1999
			JP	9506250 T	24-06-1997
			JP	3442784 B2	02-09-2003
			JP	9505889 T	10-06-1997
			WO	9514776 A1	01-06-1995
			WO	9514930 A1	01-06-1995
			US	2002147325 A1	10-10-2002
			US	2003204072 A1	30-10-2003
			US	5766863 A	16-06-1998
			US	6025145 A	15-02-2000
			US	6287784 B1	11-09-2001
			US	5914237 A	22-06-1999
			US	5891650 A	06-04-1999
			US	6096527 A	01-08-2000
			US	5709858 A	20-01-1998
			US	6087144 A	11-07-2000

**Solicitud Internacional No.
PCT/EP2004/007562**

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 9514930 A		US 2004224386 A1	11-11-2004
		US 2002137113 A1	26-09-2002

PCT

Patent Department (TR-E)		
Case <u>21695</u>	Int.-Nr.	
Literatur erfasst:	Zeichen:	Datum:
Lit.sheet Endnote	<u>976</u>	<u>24.06.05</u>
☒	☐	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Roche Diagnostics GmbH Patent Department Penzberg				
ASK	24. JUNI 2005			WN
BK				WJ
BUR	HH	HIL	MI	SR

Applicant's or agent's file reference 21695 WO-SR	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2004/007562	International filing date (day/month/year) 09/07/2004	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 10/07/2003
Applicant F. HOFFMANN-LA ROCHE AG		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 10 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box II).

3. ☒ Unity of invention is lacking (see Box III).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 36.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____

☐ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2004/007562

19

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

☒

a sequence listing

☐

table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☒

in written format

☒

in computer readable form

c. time of filing/furnishing

☒

contained in the international application as filed

☒

filed together with the international application in computer readable form

☐

furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2004/007562

19

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 16-17 are directed to a method of treatment of the human/animal body (Article 52(4) EPC), the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 16-17 are directed to a method of treatment of the human/animal body (Article 52(4) EPC), the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.1

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: -

Present claims 1-5 relates to an antibody defined by reference to a desirable characteristic or property, namely :

- ratio of IC50 values of inhibition of 1:3 to 3:1,
- inhibits faor at least 80% at a concentration of 5nM IGF-IR phosphorylation,
- shows no IGF-IR stimulating activity,
- induces cell death of 20%,
- human or humnized antibody,
- Kd of about 10exp-13 to 10exp-9 M.

The claims cover all products having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 84 EPC and/or disclosure within the meaning of Article 83 EPC for only a very limited number of such products. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 84 EPC). An attempt is made to define the product by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely claim 6.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-17,19

An antibody binding to IGF-IR and inhibiting the binding of IGF-I and IGF-II to IGF-IR with the characteristics of claim 1.

2. claim: 18

A method for the selection of an antibody against IGF-IR not having agonistic property.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/007562

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/13 C12N5/16 A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/053596 A (GALLO MICHAEL ;MILLER PENELOPE E (US); ABGENIX INC (US); COHEN BRU) 11 July 2002 (2002-07-11) cited in the application the whole document	1-17,19
X	ROHLIK QTAND AL.: "An antibody to the receptor for insulin-like growth factor I inhibits the growth of mcf-7 cells in tissue culture" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 149, no. 1, 1987, pages 276-281, XP008026319 cited in the application the whole document ----- -/-	1-17,19

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 March 2005

Date of mailing of the international search report

17. 06. 2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Vadot, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP2004/007562

24

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LI S-L ET AL: "SINGLE-CHAIN ANTIBODIES AGAINST HUMAN INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR I RECEPTOR: EXPRESSION, PURIFICATION AND EFFECT ON TUMOR GROWTH" CANCER IMMUNOLOGY AND IMMUNOTHERAPY, BERLIN, DE, vol. 49, no. 4/5, July 2000 (2000-07), pages 243-252, XP001113064 ISSN: 0340-7004 the whole document (B)	1-17,19
P,X	WO 03/100008 A (BRAMS PETER ;HAILEY JUDITH (US); SCHERING CORP (US); FEINGERSH DIA) 4 December 2003 (2003-12-04) claims -----	1-17,19
P,X	WO 03/059951 A (LEGER OLIVIER ;PF MEDICAMENT (FR); GOETSCH LILIANE (FR); CORVAIA N) 24 July 2003 (2003-07-24) claims -----	1-17,19
X	LI SHU-LIAN ET AL.: "Single-chain antibodies against human insulin-like growth factor receptor: expression, purification, and effect on tumor growth." CANCER IMMUNOL. IMMUNOTHER., vol. 49, 2000, pages 243-252, XP002267730 abstract (C)	1-17,19
X	HAILEY J. ET AL.: "Neutralizing anti-insulin-like growth factor receptor 1 antibodies inhibit receptor function and induce receptor degradation in tumor cells" MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, vol. 1, 2002, pages 1349-1353, XP008026465 abstract (D)	1-17,19
A	WO 95/14930 A (GENENTECH, INC; GODOWSKI, PAUL, J; MARK, MELANIE, R; SADICK, MICHAEL,) 1 June 1995 (1995-06-01) -----	

4

27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/007562

25

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02053596	A	11-07-2002	CA 2433800 A1	11-07-2002
			CZ 20032131 A3	14-01-2004
			EE 200300318 A	15-10-2003
			EP 1399483 A2	24-03-2004
			HU 0302525 A2	28-10-2003
			JP 2004531217 T	14-10-2004
			NO 20033074 A	04-07-2003
			SK 9932003 A3	08-06-2004
			WO 02053596 A2	11-07-2002
			US 2004086503 A1	06-05-2004
			ZA 200305995 A	04-08-2004

WO 03100008	A	04-12-2003	AU 2003241590 A1	12-12-2003
			CA 2484000 A1	04-12-2003
			EP 1506286 A2	16-02-2005
			WO 03100008 A2	04-12-2003
			US 2004018191 A1	29-01-2004

WO 03059951	A	24-07-2003	FR 2834990 A1	25-07-2003
			FR 2834900 A1	25-07-2003
			FR 2834991 A1	25-07-2003
			AU 2003216748 A1	30-07-2003
			BR 0306973 A	09-11-2004
			CA 2473039 A1	24-07-2003
			EP 1461359 A2	29-09-2004
			WO 03059951 A2	24-07-2003

WO 9514930	A	01-06-1995	US 6001621 A	14-12-1999
			AT 163231 T	15-02-1998
			AU 697142 B2	01-10-1998
			AU 1180095 A	13-06-1995
			AU 698975 B2	12-11-1998
			AU 1210895 A	13-06-1995
			CA 2175892 A1	01-06-1995
			CA 2175893 A1	01-06-1995
			DE 69408541 D1	19-03-1998
			DE 69408541 T2	06-08-1998
			DK 730740 T3	28-09-1998
			EP 0730646 A1	11-09-1996
			EP 0730740 A1	11-09-1996
			ES 2116066 T3	01-07-1998
			GR 3026430 T3	30-06-1998
			HK 1008440 A1	07-05-1999
			JP 9506250 T	24-06-1997
			JP 3442784 B2	02-09-2003
			JP 9505889 T	10-06-1997
			WO 9514776 A1	01-06-1995
			WO 9514930 A1	01-06-1995
			US 2002147325 A1	10-10-2002
			US 2003204072 A1	30-10-2003
			US 5766863 A	16-06-1998
			US 6025145 A	15-02-2000
			US 6287784 B1	11-09-2001
			US 5914237 A	22-06-1999
			US 5891650 A	06-04-1999
			US 6096527 A	01-08-2000
			US 5709858 A	20-01-1998
			US 6087144 A	11-07-2000

28

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación

Enero 20 de 2005 (20.01.2005)

(10) Número de Publicación Internacional

PCT

WO 2005/005635 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
5/16, A61K 39/395

C12N 15/13,

(74) Agente: SCHREINER, Siegfried; Roche Diagnostics GmbH,
Patent Department (TR-E), Postfach 11 52, 82372 Penzberg (DE).

(21) Número de Solicitud Internacional:

PCT/EP2004/007562

(81) Estados Designados (A menos que se indique lo contrario para cada tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Fecha de Registro Internacional:

Julio 9 de 2004 (09.07.2004)

(25) Idioma de registro:

Inglés

(26) Idioma de Publicación:

Inglés

(84) Estados Designados (A menos que se indique lo contrario para cada tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasia (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(30) Información de Prioridad:

03015526.1

Julio 10 de 2003 (10.07.2003)

EP

(71) Solicitante: (para todos los estados designados excepto Estados Unidos de América): F. HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH/CH]; Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basel (CH).

Publicado:

-sin reporte de búsqueda internacional y para ser republicado a la recepción de ese reporte

(72) Inventores; e

(72) Inventores/Solicitantes (para Estados Unidos de América solamente): GRAUS, Yvo [NL/NL]; Pienemanstraat 112, NL 6717 WG Ede (NL). KOPETZKI, Erhard [DE/DE]; Kastnerhofstr. 21, 82377 Penzberg (DE). KUENKELE, Klaus-Peter [DE/DE]; Karwendelstrasse 9, 83671 Benediktbeuern (DE). MUNDIGL, Olaf [DE/DE]; Tassiloring 16, 82362 Weilheim (DE). PARREN, Paul [NL/NL]; Werderpervwaard 17, NL-3984 PR Odijk (NL). REBERS, Frank [NL/NL]; Adriaan Menninckkwartier 34, NL-3554 CT Utrecht (NL). SCHUMACHER, Ralf [DE/DE]; Hochfeldstrasse 78, 82377 Penzberg (DE). VAN DE WINKEL, Jan [NL/NL]; Verlengde Slotlaan 80, NL-3707 CK Zeist (NL). VRIESEMA-VAN VUGT, Martine [NL/NL]; Fluweelmos 6, NL-3994 KR Houten (NL).

- Con una indicación(en) en relación con el material biológico depositado suministrado bajo la Regla 13bis separadamente de la descripción

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase a "Las Notas Guías sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: "ANTICUERPOS CONTRA EL RECEPTOR I DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE TIPO INSULINICO Y USOS DE LOS MISMOS"



57) Resumen: Un anticuerpo unido a IGF-IR e inhibiendo la unión de IGF-I y IGF-II a IGF-IR que se caracteriza en que dicho anticuerpo es a) es del isótopo IgG1, b) muestra una proporción de valores de CI_{50} de inhibición de la unión de IGF-I a IGF-IR a la inhibición de la unión de IGF-II a IGF-IR de 1:3 a 3:1, c) inhibe para al menos un 80% a una concentración de 5 nM la fosforilación IGF-IR en un ensayo de fosforilación celular usando células 3T3 proporcionando 400.000 a 600.000 moléculas IGF-IR por célula en un medio que contiene suero de ternera fetal inactivado por calor 0,5% (FCS) cuando se compara con tal ensayo sin dicho anticuerpo, y d) no muestra actividad estimulante IGF-IR medida como la fosforilación IGF-IR a una concentración de 10 μ M en un ensayo de fosforilación celular usando células 3T3 proporcionando 400.000 a 600.000 moléculas IGF-IR por célula en un medio que contiene suero de ternera fetal inactivado por calor 0,5% (FCS) cuando se compara con tal ensayo sin dicho anticuerpo tiene propiedades mejoradas en una terapia antitumoral.

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
20 January 2005 (20.01.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/005635 A2

(51) International Patent Classification⁷: C12N 15/13,
5/16, A61K 39/395

(21) International Application Number:
PCT/EP2004/007562

(22) International Filing Date: 9 July 2004 (09.07.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
03015526.1 10 July 2003 (10.07.2003) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): F. HOFF-
MANN-LA ROCHE AG [CH/CH]; Grenzacherstrasse
124, CH-4070 Basel (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): GRAUS, Yvo
[NL/NL]; Plenemanstraat 112, NL-6717 WG Bde (NL).
KOPETZKI, Erhard [DE/DE]; Kastnerhofstr. 21,
82377 Penzberg (DE). KUENKELE, Klaus-Peter
[DE/DE]; Karwendelstrasse 9, 83671 Benediktbeuern
(DE). MUNDIGL, Olaf [DE/DE]; Tauschweg 16, 82362

Weilheim (DE). PARREN, Paul [NL/NL]; Werdorper-
waard 17, NL-3984 PR Odijk (NL). REBERS, Frank
[NL/NL]; Adriaan Menninckkwartier 34, NL-3554 CT
Utrecht (NL). SCHUMACHER, Ralf [DE/DE]; Hochfeld-
strasse 78, 82377 Penzberg (DE). VAN DE WINKEL,
Jan [NL/NL]; Vriensde Sijlaan 80, NL-3707 CK Zeist
(NL). VRIESEMA-VAN VUGT, Martine [NL/NL];
Fluweelmos 6, NL-3994 KR Houten (NL).

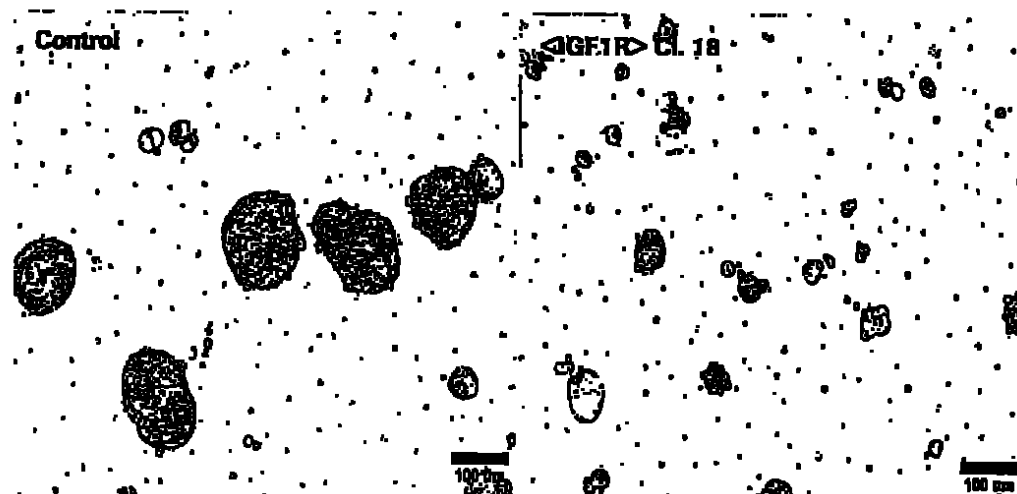
(74) Agent: SCHREINER, Siegfried; Roche Diagnostics
GmbH, Patent Department (TR-E), Postfach 11 52, 82372
Penzberg (DE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,

[Continued on next page]

(54) Title: ANTIBODIES AGAINST INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR I RECEPTOR AND USES THEREOF



(57) Abstract: An antibody binding to IGF-IR and inhibiting the binding of IGF-I and IGF-II to IGF-IR which is characterized in that said antibody is a) is of IgG1 isotype, b) shows a ratio of IC₅₀ values of inhibition of the binding of IGF-I to IGF-IR to the inhibition of binding of IGF-II to IGF-IR of 1:3 to 3:1, c) inhibits for at least 80% at a concentration of 5 nM IGF-IR phosphorylation in a cellular phosphorylation assay using 3T3 cells providing 400,000 to 600,000 molecules IGF-IR per cell in a medium containing 0.5% heat inactivated fetal calf serum (FCS) when compared to such an assay without said antibody, and d) shows no IGF-IR stimulating activity measured as IGF-IR phosphorylation at a concentration of 10 µM in a cellular phosphorylation assay using 3T3 providing 400,000 to 600,000 molecules IGF-IR per cell in a medium containing 0.5% heat inactivated fetal calf serum (FCS) when compared to such an assay without said antibody has improved properties in antitumor therapy.

— with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

30

De la OFICINA INTERNACIONAL

PCT

NOTIFICACION DEL REGISTRO
DE UN CAMBIO(Regla 92 bis. 1 del PCT e
Instrucciones Administrativas, Sección 422)

Para:

SCHREINER, Siegfried
Roche Diagnostics GmbH
Patent Department (TR-E)
Postfach 11 52
82372 Penzberg
AlemaniaFecha de envío por correo (día/mes/año)
18 de Octubre de 2005 (18.10.2005)Archivo de referencia del solicitante o agente
21695 WO-SR

NOTIFICACION IMPORTANTE

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2004/007562Fecha de registro Internacional (día/mes/año)
09 de Julio de 2004 (09.07.2004)

1. Las siguientes indicaciones aparecieron en el registro en relación con:

☒ el solicitante ☒ el inventor ☐ el agente ☐ el representante comúnNombre y Dirección
GRAUS, Yvo
Pienemanstraat 112
NL-6717 WG Ede
HolandaPaís de Nacionalidad
NLPaís de Residencia
NL

No. Teléfono

No. Facsímile

No. Teleimpresora

2. La Oficina Internacional por el presente notifica al solicitante que el siguiente cambio se ha registrado en relación con:

☐ la persona ☐ el nombre ☒ la dirección ☐ la nacionalidad ☐ la residenciaNombre y Dirección
GRAUS, Yvo
Werdorperwaard 3
NL-3984 PR Odijk
HolandaPaís de Nacionalidad
NLPaís de Residencia
NL

No. Teléfono

No. Facsímile

No. Teleimpresora

3. Otras observaciones, si fuese necesario:

4. Se ha enviado una copia de esta notificación a:

☒ la Oficina que recibe ☐ las Oficinas designadas relacionadas
☐ la Autoridad de Búsqueda Internacional ☒ las Oficinas seleccionadas relacionadas
☒ la Autoridad de Examen Preliminar Internacional ☐ otros:The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsímile No.: (41-22) 338.89.70

Funcionario autorizado
Frédéric SONTAG (fax 338 8970)

Teléfono No.: (41-22) 338.8391

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

SCHREINER, Siegfried
Roche Diagnostics GmbH
Patent Department (T-8)
Postfach 11 52
82372 Penzberg
Germany

Roche Diagnostics GmbH Patent Department Penzberg				
ABK	27. Okt. 2005			WN
BR				W
BUR	HH	MIL	MI	SR

Date of mailing (day/month/year) 18 October 2005 (18.10.2005)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 21695 WO-SR	
International application No. PCT/EP2004/007562	International filing date (day/month/year) 09 July 2004 (09.07.2004)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

GRAUS, Yvo
Pienemanstraat 112
NL-6717 WG Ede
Netherlands

State of Nationality

NL

State of Residence

NL

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

GRAUS, Yvo
Werdorperwaard 3
NL-3984 PR Odijk
Netherlands

State of Nationality

NL

State of Residence

NL

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned
☒ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 338.89.70

Authorized officer

Frédéric SONTAG (Fax 338 8970)

Telephone No. (41-22) 338 8391

De la OFICINA INTERNACIONAL

PCT

NOTIFICACION DEL REGISTRO
DE UN CAMBIO(Regla 92 bis. 1 del PCT e
Instrucciones Administrativas, Sección 422)

Para:

SCHREINER, Siegfried
Roche Diagnostics GmbH
Patent Department (TR-E)
Postfach 11 52
82372 Penzberg
AlemaniaFecha de envío por correo (día/mes/año)
18 de Octubre de 2005 (18.10.2005)Archivo de referencia del solicitante o agente
21695 WO-SR

NOTIFICACION IMPORTANTE

Solicitud Internacional No.
PCT/EP2004/007562Fecha de registro internacional (día/mes/año)
09 de Julio de 2004 (09.07.2004)

1. Las siguientes indicaciones aparecieron en el registro en relación con:

☒ el solicitante ☒ el inventor ☐ el agente ☐ el representante comúnNombre y Dirección
VRIESEMA-VAN VUGT, Martine
Fluweelmos 6
NL-3994 KR Houten
HolandaPaís de Nacionalidad
NLPaís de Residencia
NL

No. Teléfono

No. Facsímile

No. Teleimpresora

2. La Oficina Internacional por el presente notifica al solicitante que el siguiente cambio se ha registrado en relación con:

☐ la persona ☒ el nombre ☐ la dirección ☐ la nacionalidad ☐ la residenciaNombre y Dirección
VAN VUGT, Martine
Fluweelmos 6
NL-3994 KR Houten
HolandaPaís de Nacionalidad
NLPaís de Residencia
NL

No. Teléfono

No. Facsímile

No. Teleimpresora

3. Otras observaciones, si fuese necesario:

4. Se ha enviado una copia de esta notificación a:

☒ la Oficina que recibe ☐ las Oficinas designadas relacionadas
☐ la Autoridad de Búsqueda Internacional ☒ las Oficinas seleccionadas relacionadas
☒ la Autoridad de Examen Preliminar Internacional ☐ otros:The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsímile No.: (41-22) 338.89.70

Funcionario autorizado

Frédéric SONTAG (fax 338 8970)

Teléfono No.: (41-22) 338.8391

PATENT COOPERATION TREATY

33

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SCHREINER, Siegfried
Roche Diagnostics GmbH
Patent Department (P.B.E.)
Postfach 11 52
82372 Penzberg
Germany

Roche Diagnostics GmbH Patent Department Penzberg	
ASK	27. Okt. 2005
BK	WN
BUR	VL
HI	MI
NI	SI

Date of mailing (day/month/year) 18 October 2005 (18.10.2005)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 21695 WO-SR	
International application No. PCT/EP2004/007562	International filing date (day/month/year) 09 July 2004 (09.07.2004)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

VRIESEMA-VAN VUGT, Martine
Fluweelmos 6
NL-3994 KR Houten
Netherlands

State of Nationality

NL

State of Residence

NL

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

VAN VUGT, Martine
Fluweelmos 6
NL-3994 KR Houten
Netherlands

State of Nationality

NL

State of Residence

NL

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned
☒ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 338.88.70

Authorized officer

Frédéric SONTAG (Fax 338 8970)

Telephone No. (41-22) 338 8391

36

C. INDICACIONES ADICIONALES (hoja adicional)**Solicitantes:** F. Hoffman-La Roche AG, et al.**Referencia de Archivo del Solicitante:** 21895 WO-SR**Solicitud Internacional No.:** PCT/EP2004/007562**Indicaciones Relacionadas con la Solución Pericial con respecto al Material Biológico
Depositado al que se Refiere la Descripción**

Las Indicaciones relacionadas con material biológico depositado están todas contenidas en la descripción. No se requiere que las siguientes indicaciones adicionales sean parte de la descripción y deben ser tratadas como "indicaciones separadas", se relacionan solamente con la solución pericial.

Las Indicaciones adicionales hechas a continuación están relacionadas con el material biológico depositado, referido como:

<IGF-IR>HUMAB-Clon18 DSM ACC2587

<IGF-IR>HUMAB-Clon 22 DSM ACC2594

En la descripción en la página 5.

Las Indicaciones adicionales son:**Para la designación CA (Canadá):**

Con respecto a la designación de Canadá, las muestras del material biológico depositado estarán disponibles hasta la Adjudicación de la patente Canadiense, o hasta la fecha en la cual la solicitud es negada, o es abandonada y nunca más sujeta a restitución, o su retiro, como se provee en las Reglas 107 y 108 de las Reglas de Patente, bajo el Acto de Patente Canadiense, solamente mediante la emisión de una muestra a un experto independiente nombrado por el Comisionado (Regla 104(4)).

Para la designación EP (Patente Europea):

Con respecto a la designación de la EPO, las muestras del material biológico depositado estarán disponibles hasta la publicación de la mención de concesión de la patente Europea, o hasta 20 años a partir de la fecha de registro si la solicitud es rechazada o retirada, o si se considera retirada, según se provee en la Regla 28(3) de las Regulaciones De Implementación, bajo la EPC, solamente mediante la emisión de una muestra a un experto independiente nombrado por el peticionario (Regla 28(4) EPC).

Para la designación SG (Singapur):

Por medio de la presente, el Solicitante da aviso de nuestra intención que las muestras del cultivo mencionado anteriormente estarán disponibles solamente para los expertos, de acuerdo con el párrafo 3 del Cuarto Programa de las Reglas de Patentes 1995.

Referencia de Archivo del Solicitante o Agente: 21685 WO-SR	Solicitud Internacional: PCT/EP2004/007562
--	---

INDICACIONES RELACIONADAS CON MICROORGANISMOS DEPOSITADOS U OTRO
MATERIAL BIOLÓGICO

(PCT Regla 13 bis)

A. Las Indicaciones hechas a continuación se relacionan con el microorganismo depositado u otro material biológico al que se refiere la Descripción en la página 5, línea <u>tabla</u>	
B. IDENTIFICACION DEL DEPOSITO	
Depósitos adicionales se identifican en una hoja adicional	
Nombre de la institución depositaria Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GMBH (DSMZ)	
Dirección de la institución depositaria (Incluyendo código postal y país) Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig Alemania	
Fecha del depósito: 10.04.2003*/09.05.2003**	Número de Acceso: DSM ACC2587*, DSM ACC 2594**
C. INDICACIONES ADICIONALES (dejar en blanco si no aplica)	
Esta información continúa en una hoja adicional	
Indicaciones relacionadas con la Solución Experta con respecto al material biológico depositado DSM ACC2587, y DSM ACC2594	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS CUALES SE HACEN LAS INDICACIONES ADICIONALES (Si las indicaciones no son para todos los Estados designados)	
CA (Canadá), EP (Patente Europea), SG (Singapur)	
E. SUMINISTRO SEPARADO DE INDICACIONES (dejar en blanco si no aplica)	
Las indicaciones listadas a continuación serán sometidas al Bureau Internacional después (especifique la naturaleza general de la indicación, e.g., "Número de Acceso del Depósito")	

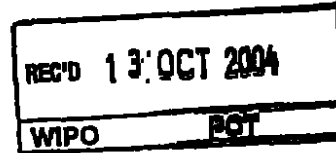
Para uso de la Oficina Receptora Solamente	Para uso del Bureau Internacional Solamente
Esta hoja fue recibida con la solicitud Internacional	Esta hoja fue recibida por el Bureau Internacional el <u>13 de Oct de 2004</u>
Funcionario Autorizado	Funcionario Autorizado
	(Firma)

C. ADDITIONAL INDICATIONS (additional sheet)

Applicants : F. Hoffmann-La Roche AG, et al.

Applicants file reference : 21695 WO-SR

International application No. : PCT/EP2004/007562



**Indications Relating to the Expert Solution in Respect of Deposited Biological Material
Referred to in the Description**

The indications relating to deposited biological material are all contained in the description. The following additional indications are not required to be part of the description and should be treated as "separate indications." They relate only to the expert solution.

The additional indications made below relate to the deposited biological material referred to as:

<IGF-1R>HUMAB-Clone 18 DSM ACC2587

<IGF-1R>HUMAB-Clone 22 DSM ACC2594

in the description on page 5.

The additional indications are:

For CA (Canada) designation:

In respect of the designation of Canada, samples of the deposited biological material will be made available until the grant of the Canadian patent, or until the date on which the application is refused, or is abandoned and no longer subject to reinstatement, or is withdrawn, as provided in Rules 107 and 108 of the Patent Rules under the Canadian Patent Act, only by the issue of a sample to an independent expert nominated by the Commissioner (Rule 104(4))

For EP (European Patent) designation:

In respect of the designation of the EPO, samples of the deposited biological material will be made available until the publication of the mention of the grant of the European patent, or until 20 years from the date of filing if the application is refused or withdrawn or is deemed to be withdrawn, as provided in Rule 28(3) of the Implementing Regulations under the EPC, only by the issue of a sample to an expert nominated by requester (Rule 28(4) EPC).

For SG (Singapore) designation:

Applicants hereby give notice of our intention that samples of the above-identified culture shall be available only to experts in accordance with paragraph 3 of the Fourth Schedule to the Patents Rules 1995.

37 51

Applicant's or agent's file reference 21605 WO-SR	International application No. PCT/EP2004/007562
--	--

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

(PCT Rule 13bis)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 5, line table	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet ☐	
Name of depository institution Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)	
Address of depository institution (including postal code and country) Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig Germany	
Date of deposit 10.04.2003* / 09.05.2003**	Accession Number DSM ACC2587*, DSM ACC 2594**
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet ☒	
Indications relating to the Expert Solution in respect of the deposited biological material DSM ACC2587, and DSM ACC 2594	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States) CA (Canada), EP (European Patent), SG (Singapore)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable) The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only ☐ This sheet was received with the international application Authorized officer	For International Bureau use only ☒ This sheet was received by the International Bureau on: 13 OCT 2004 Authorized officer H. HERNANDEZ

6

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES PCT

REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD

(Capítulo II del Tratado de Cooperación de Patentes)
(PCT Artículo 36 y Regla 70)

38

Registro de referencia del solicitante o agente Case 21695 WO-SR	PARA FUTURAS ACCIONES Ver Forma PCT/IPEA/416																									
Solicitud Internacional No. PCT/EP2004/007562	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 09.07.2004	Fecha de prioridad (día/mes/año) 10.07.2003																								
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC C12N15/13, C12N5/16, A61K39/395																										
Solicitante F. HOFFMANN-LA ROCHE AG et al.																										
1. Este reporte es el reporte de examen preliminar internacional, establecido por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional bajo el Artículo 35 y transmitido al solicitante de conformidad con el Artículo 36. 2. Este REPORTE consta de un total de 8 / hojas, incluyendo esta carátula. 3. Este reporte también es acompañado por ANEXOS, que comprenden: a. ☐ (enviado al solicitante y a la Oficina Internacional) un total de _____ hojas, como sigue: ☐ hojas de la descripción, reivindicaciones y/o dibujos los cuales han sido modificados y son la base de este reporte y/o hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Autoridad (ver Regla 70.16 y Sección 607 de las Instrucciones Administrativas). ☐ hojas que reemplazan hojas anteriores, pero las cuales esta Autoridad considera que contienen una modificación que va más allá de la revelación en la solicitud internacional como se presentó, como se indicó en el ítem 4 de la Casilla No. I y la Casilla Suplementaria. b. ☐ (enviado únicamente a la Oficina Internacional) un total de (indicar tipo y número de medio(s) electrónico(s)) _____, que contienen un listado de secuencias y/o tablas con ello, únicamente en una forma legible en computador, como se indicó en la Casilla Suplementaria Relacionada con el Listado de Secuencias (ver Sección 802 de las Instrucciones Administrativas).																										
4. Este reporte contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 10%;">☒</td> <td style="width: 20%;">Casilla No. I</td> <td>Bases del Reporte</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No. II</td> <td>Prioridad</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No. III</td> <td>No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial.</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No. IV</td> <td>Falta de unidad de invención</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No. V</td> <td>Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación.</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No. VI</td> <td>Ciertos documentos citados</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No. VII</td> <td>Ciertos defectos en la solicitud internacional</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No. VIII</td> <td>Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional</td> </tr> </table>			☒	Casilla No. I	Bases del Reporte	☐	Casilla No. II	Prioridad	☒	Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial.	☒	Casilla No. IV	Falta de unidad de invención	☒	Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación.	☐	Casilla No. VI	Ciertos documentos citados	☐	Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional	☐	Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional
☒	Casilla No. I	Bases del Reporte																								
☐	Casilla No. II	Prioridad																								
☒	Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial.																								
☒	Casilla No. IV	Falta de unidad de invención																								
☒	Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación.																								
☐	Casilla No. VI	Ciertos documentos citados																								
☐	Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional																								
☐	Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional																								
Fecha de presentación de la demanda 31.01.2005	Fecha de terminación de este reporte 04.11.2005																									
Nombre y dirección de correo de la Autoridad de examen preliminar internacional European Patent Office-P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 -2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016	Funcionario autorizado Vadot, P Teléfono No. +31 70 340-																									

41

Casilla No. I Bases del reporte

1. Respecto al idioma, este reporte se basó en la solicitud internacional en el idioma en el cual fue presentada, a menos que se indique lo contrario según este ítem.

☐ Este Reporte se basó en una traducción del idioma original al siguiente idioma, el cual es el idioma de una traducción suministrada para los propósitos de:

☐ búsqueda internacional (según la Regla 12.3. y 23.1 (b)).

☐ publicación de la solicitud internacional (según la Regla 12.4)

☐ examen preliminar internacional (según las Reglas 55.2 y/o 55.3).

2. Respecto a los elementos de la solicitud internacional, este reporte se basa en (Páginas de remplazo que han sido suministradas a la oficina receptora en respuesta a una invitación bajo el artículo 14 están referenciados en este reporte como "presentados originalmente" y no están anexos a este reporte):

Descripción, Páginas

1-47 como se presentaron originalmente

Listado de Secuencias parte de la descripción, Páginas

1-9 como se presentaron originalmente

Reivindicaciones, Números

1-19 como se presentaron originalmente

Dibujos, Hojas

1/12-12/12 como se presentaron originalmente

☒ la secuencia numerada y/o alguna tabla(s)-ver Casilla Suplementaria a la Secuencia Numerada

3. ☐ Las modificaciones resultaron en la cancelación de:

☐ la descripción, páginas

☐ las reivindicaciones, Nos.

☐ los dibujos, hojas/figuras

☐ listado de secuencia (especificar)

☐ cualquier tabla(s) relacionadas con la serie de listados (especificar)

4. ☐ Este reporte ha sido establecido como si (alguno de) los anexos corregidos a este reporte y numerado antes no ha sido hecho, desde que ellos han sido considerados a través de la presentación original, como esta indicado en la casilla suplementaria (regla 70.2(c)).

☐ la descripción, páginas

☐ las reivindicaciones, Nos.

☐ los dibujos, hojas/figuras

☐ secuencia que enumera (especificar)

☐ algunas tabla(s) relatando secuencia numerada (especificar)

*si el ítem 4 aplica, algunas o todas aquellas hojas pueden ser marcadas "reemplazadas"

Casilla No. III. No establecimiento de opinión respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial

1. Las cuestiones de si la invención reivindicada parece ser novedosa, involucrar nivel inventivo (ser no obvia) o ser industrialmente aplicable no han sido examinadas respecto a:

☐ toda la solicitud internacional

☒ las reivindicaciones Nos. 1-5 (todas parcialmente; 16-17 como a IA; 18 (completamente)

porque:

☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 16, 17 como a IA se relacionan con la siguiente materia objeto las cuales no requieren examen preliminar internacional (*especificar*):
ver hoja separada

☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique elementos particulares a continuación*) o dichas reivindicaciones Nos. son tan imprecisas que no pudo formarse una opinión significativa (*especifique*):

☐ las reivindicaciones o dichas reivindicaciones Nos. están sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no pudo formarse una opinión significativa.

☒ no se ha establecido un reporte de búsqueda internacional para dichas reivindicaciones Nos. 1-5 (todas parcialmente); 18 (completamente)

☐ el listado de secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos no cumple con la norma proporcionada por el Anexo C de las Instrucciones Administrativas en que:

la forma escrita

☐ no ha sido suministrada

☐ no cumple con la norma

la forma legible en computador

☐ no ha sido suministrada

☐ no cumple con la norma

☐ las tablas relacionadas con el listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos, si únicamente en forma legible en computador, no cumple con los requerimientos técnicos proporcionados por el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.

☐ Ver Casilla Suplementaria para detalles adicionales.

**REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL
SOBRE PATENTABILIDAD**

Solicitud internacional No.
PCT/EP2004/007562

41

Casilla No. IV Falta de unidad de invención

1. ☒ En respuesta a la invitación para restringir o pagar derechos adicionales el solicitante ha:
- ☐ restringido las reivindicaciones.
 - ☐ pagado derechos adicionales.
 - ☐ pagado derechos adicionales bajo protesta.
 - ☒ ni restringido ni pagado derechos adicionales.
2. ☐ Esta Autoridad encontró que el requisito de unidad de invención no se ha cumplido y escogió, de conformidad con la Regla 68.1, no invitar al solicitante para que restrinja o pague derechos adicionales.
3. Esta Autoridad considera que el requisito de unidad de invención de acuerdo con las Reglas 13.1, 13.2 y 13.3 es
- ☐ se ha cumplido.
 - ☒ no se ha cumplido por las siguientes razones:
ver hoja separada
4. Por consiguiente, las siguientes partes de la solicitud internacional fueron el objeto del examen preliminar internacional para establecer en este reporte:
- ☐ Todas las partes.
 - ☒ Las partes que se relacionan con las reivindicaciones Nos. 1-17, 19.

Casilla No. V Afirmación razonada bajo el Artículo 35(2) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Afirmación

Novedad (N)	Sí: Reivindicaciones 1-17, 19 No: Reivindicaciones
Nivel inventivo (IS)	Sí: Reivindicaciones No: Reivindicaciones 1-17, 19
Aplicabilidad industrial (IA)	Sí: Reivindicaciones 1-15, 19 No: Reivindicaciones

2. Citaciones y explicaciones (Regla 70.7):

ver hoja separada

**REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE
PATENTABILIDAD**

Solicitud internacional No.
PCT/EP2004/007562

Casilla Suplementaria Relacionada con el Listado de Secuencia

Continuación de la Casilla I, ítem 2:

1. Respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia aminoácida revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta reporte se ha establecido según:

a. tipo de material:

- ☒ un listado de secuencia
☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia

b. formato de material:

- ☒ en formato escrito
☒ en formato legible por computador

c. tiempo de presentación/suministro:

- ☒ contenido en la solicitud internacional según se registró.
☒ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador.
☐ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para los propósitos de búsqueda y/o examen
☐ recibida por esta Autoridad como una enmienda en

2. ☐ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.

3.. Comentarios adicionales si es necesario:

Re Item III

No se establece opinión con respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial.

3.1 Las reivindicaciones 16-17 involucran composiciones o sustancias en un método para el tratamiento del cuerpo animal/humano.

Para la evaluación de las presentes reivindicaciones 16-17 acerca de la pregunta si son aplicables industrialmente, no existe un criterio unificado en los Estados Contratantes de PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. La EP, por ejemplo, no reconoce como industrialmente aplicable el objeto de las reivindicaciones para el uso de un compuesto en un tratamiento médico y el uso de dicho compuesto para la fabricación de un medicamento para un nuevo tratamiento médico

3.2 No se realizará Examen Preliminar Internacional con respecto al objeto que no está cubierto por el reporte de búsqueda (Regla 66.1 (e) PCT).

Las presentes reivindicaciones 1-5 están relacionadas con un anticuerpo definido por referencia a una característica o propiedad deseable, a saber:

- relación de valores IC50 o inhibición de 1:3 a 3:1,
- inhibe por al menos 80% a una concentración de fosforilación IGF-IR 5 nM,
- no muestra actividad estimulada por IGF-IR,
- induce la muerte celular del 20%,
- anticuerpo humano o humanizado
- Kd de aproximadamente 10e-13 a 10e-9 M.

Las reivindicaciones cubren todos los productos que tienen esta característica o propiedad, mientras que la solicitud provee soporte dentro del significado del Artículo 6 PCT y/o revelación dentro del significado del Artículo 5 PCT para solamente un número muy limitado de tales productos. En el caso presente, las reivindicaciones carecen tanto de soporte, y la solicitud carece tanto de revelación, que es imposible una búsqueda significativa sobre el alcance total reivindicado. Independientemente del razonamiento anterior, las reivindicaciones también carecen de claridad (Artículo 6 PCT). Se hace un intento para definir el producto por la referencia a un resultado a ser alcanzado. De nuevo, esta falta de claridad en el caso presente es tal que hace imposible una búsqueda significativa sobre el alcance total reivindicado. En consecuencia, se ha realizado la búsqueda para aquellas partes de las reivindicaciones que parecen estar claras, soportadas y reveladas, a saber la reivindicación 6.

44

Re ítem IV

Falta de Unidad de Invención

El problema es proveer anticuerpos que se enlazan a IGF-IR e inhibe el enlaza de IGF-I e IGF-II a IGF-IR.

Las soluciones propuestas son:

- 1) Un anticuerpo que se enlaza a IGF-IR e inhibe el enlaza de IGF-I e IGF-II a IGF-IR, con las características de la reivindicación 1.
- 2) Un método para la selección de un anticuerpo contra IGF-IR que no tiene propiedad agonística.

La característica técnica del método de la reivindicación 18 reside en el paso de observar la ausencia de propiedad agonística de los compuestos candidatos en un ensayo de selección. No existe relación de fabricación entre el método de selección y los anticuerpos relacionados. Adicionalmente, el método de selección no es un método para usar los anticuerpos reivindicados. En ausencia de cualquier enseñanza en cuanto a la estructura requerida para que un anticuerpo actúe sin propiedad agonística, no hay un solo concepto que relacione el método a los anticuerpos relacionados. Así, carece de unidad de invención (*a priori*).

Re ítem V

Declaración razonada con respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que soportan dicha declaración.

Se hace referencia a los siguientes documentos:

D1: WO-A-02053596

Novedad:

47

El documento D1 revela (las referencias en paréntesis que aplican a este documento): anticuerpos humanos contra el receptor IGF-I. Estos anticuerpos tienen alguna característica funcional específica como por ejemplo, Inhiben la fosforilación de tirosina inducida por IGF-IR (ver reivindicación 3).

La presente solicitud cumple los criterios del Artículo 33(1) PCT, porque el objeto de las reivindicaciones 1-17, 19 es nueva sobre D1 en el sentido del Artículo 33(2) PCT.

Nivel Inventivo:

El documento D1 es considerado como la técnica previa más cercana al objeto de las reivindicaciones 1-17, 19, y revela (las referencias en paréntesis que aplican a este documento) anticuerpos humanos contra el receptor IGF-I. Estos anticuerpos tienen alguna característica funcional específica como por ejemplo, Inhiben la fosforilación de tirosina inducida por IGF-IR (ver reivindicación 3).

Parece que si existen al menos dos anticuerpos diferentes, el de D1 y el otro en la presente solicitud. Es muy improbable que estos anticuerpos elevados a un antígeno particular compartan una secuencia de amino ácido idéntica, por lo tanto hay una diferencia, el efecto de esta diferencia no es conocido.

El problema objetivo a ser resuelto por la presente invención es la provisión de otro anticuerpo que se enlaza a IGF-IR. No hay un efecto especial asociado con el anticuerpo de la solicitud, comparado con el anticuerpo revelado en D1.

En ausencia de cualquier efecto técnico sorprendente o inesperado del Ab de la presente invención, la simple provisión de un anticuerpo diferente no es suficiente para garantizar el reconocimiento de un nivel inventivo.

La presente solicitud no cumple los criterios del Artículo 33(1) PCT, porque el objeto de las reivindicaciones 1-17, 19 no involucra un nivel inventivo en el sentido del Artículo 33(3) PCT.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 21695 WO-SR	FOR FURTHER ACTION See Form PCT/PEPA/16	
International application No. PCT/EP2004/007562	International filing date (day/month/year) 09.07.2004	Priority date (day/month/year) 10.07.2003
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N15/13, C12N5/16, A61K39/395		
Applicant F. HOFFMANN-LA ROCHE AG et al.		
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ sent to the applicant and to the International Bureau a total of sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 807 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (Indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in computer readable form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).		
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the opinion ☐ Box No. II Priority ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☒ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application		
Date of submission of the demand 31.01.2005	Date of completion of this report 04.11.2005	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tlx 31 851 epo nl Fax +31 70 340 - 3018	Authorized Officer Vadot, P Telephone No. +31 70 340- 	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2004/007562

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the language, this report is based on the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
- ☐ This report is based on translations from the original language into the following language, which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ International search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4)
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3)
2. With regard to the elements* of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

Description, Pages

1-47 as originally filed

Sequence listings part of the description, Pages

1-9 as originally filed

Claims, Numbers

1-19 as originally filed

Drawings, Sheets

1/12-12/12 as originally filed

☒ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):

* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2004/007562

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, Inventive step and Industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an Inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:
- ☐ the entire international application,
 - ☒ claims Nos. 1-5 (all partially); 16-17 as to IA ; 18 (completely)
because:
 - ☒ the said international application, or the said claims Nos. 16,17 as to IA relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):
see separate sheet
 - ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
 - ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion-- could be formed.
 - ☒ no international search report has been established for the said claims Nos. 1-5 (all partially); 18 (completely)
 - ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:
 - the written form ☐ has not been furnished
 - ☐ does not comply with the standard
 - the computer readable form ☐ has not been furnished
 - ☐ does not comply with the standard
 - ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
 - ☐ See separate sheet for further details

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2004/007562

49

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation to restrict or pay additional fees, the applicant has:
 - ☐ restricted the claims.
 - ☐ paid additional fees.
 - ☐ paid additional fees under protest.
 - ☒ neither restricted nor paid additional fees.
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is
 - ☐ complied with.
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
 - ☐ all parts.
 - ☒ the parts relating to claims Nos. 1-17,19 .

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-17,19
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-17,19
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-15,19
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2004/007562

Supplemental Box relating to Sequence Listing

Continuation of Box I, Item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this report has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ in written format
 - ☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed
 - ☒ filed together with the international application in computer readable form
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination
 - ☐ received by this Authority as an amendment on
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional observations, if necessary:

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

3.1 Claims 16-17 involve compositions or substances in a method of treatment of the human/animal body.

For the assessment of the present claims 16-17 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EP, for instance, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

3.2 No International Preliminary Examination will be carried out in respect of subject-matter which is not covered by the search report (Rule 66.1(e) PCT).

Present claims 1-5 relate to an antibody defined by reference to a desirable characteristic or property, namely :

- ratio of IC50 values of inhibition of 1:3 to 3:1,
- inhibits for at least 80% at a concentration of 5nM IGF-IR phosphorylation,
- shows no IGF-IR stimulating activity,
- induces cell death of 20%,
- human or humanized antibody,
- Kd of about 10×10^{-13} to 10×10^{-9} M.

The claims cover all products having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such products. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the product by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely claim 6.

Re Item IV

Lack of unity of invention

The problem is to provide antibodies binding IGF-IR and inhibiting the binding of IGF-I and IGF-II to IGF-IR.

The proposed solutions are:

- 1) An antibody binding to IGF-IR and inhibiting the binding of IGF-I and IGF-II to IGF-IR with the characteristics of claim 1.
- 2) A method for the selection of an antibody against IGF-IR not having agonistic property.

The technical feature of method claim 18 resides in the step of observing the absence of agonistic property of the candidate compounds in a screening assay. No manufacturing relationship exists between the screening method and the claimed antibodies. Further, the screening method is not a method of using claimed antibodies. In the absence of any teaching as to the structure required for an antibody to act without agonistic property, there is no single concept that links the method to the claimed antibodies. Thus, unity of invention is lacking (*a priori*).

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Reference is made to the following documents:

D1: WO-A-02053596

Novelty:

The document D1 discloses (the references in parentheses applying to this document): human antibodies against IGF-I receptor. These antibodies have some specific functional feature as for instance they inhibit IGF-IR-induced tyrosine phosphorylation (see claim 3).

The present application meets the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1-17,19 is new over D1 in the sense of Article 33(2) PCT.

Inventive step:

The document D1 is regarded as being the closest prior art to the subject-matter of claims 1-17,19, and discloses (the references in parentheses applying to this document) human antibodies against IGF-I receptor. These antibodies have some specific functional feature as for instance they inhibit IGF-IR-induced tyrosine phosphorylation (see claim 3).

It appears as if at least two different antibodies exist, the one in D1 and the other one in the present application. It is very unlikely that these antibodies raised to a particular antigen will share an identical amino acid sequence, so there is a difference, the effect of this difference is not known.

The objective problem to be solved by the present invention is the provision of another antibody binding to IGF-IR. There is no special effect associated with the antibody of the application compared to the antibody disclosed in D1.

In the absence of any surprising or unexpected technical effect of the Ab of the present application, the simple provision of a different antibody is not sufficient to warrant the recognition of an inventive step.

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1-17,19 does not involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.

**ANTICUERPO S CONTRA EL RECEPTOR I DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE
TIPO INSULINICO Y USOS DE LOS MISMOS**

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

Un anticuerpo unido a IGF-IR e inhibiendo la unión de IGF-I y IGF-II a IGF-IR que se caracteriza en que dicho anticuerpo es a) es del isótopo IgG1, b) muestra una proporción de valores de CI_{50} de inhibición de la unión de IGF-I a IGF-IR a la inhibición de la unión de IGF-II a IGF-IR de 1:3 a 3:1, c) inhibe para al menos un 80% a una concentración de 5 nM la fosforilación IGF-IR en un ensayo de fosforilación celular usando células 3T3 proporcionando 400.000 a 600.000 moléculas IGF-IR por célula en un medio que contiene suero de ternera fetal inactivado por calor 0,5% (FCS) cuando se compara con tal ensayo sin dicho anticuerpo, y d) no muestra actividad estimulante IGF-IR medida como la fosforilación IGF-IR a una concentración de 10 μ M en un ensayo de fosforilación celular usando células 3T3 proporcionando 400.000 a 600.000 moléculas IGF-IR por célula en un medio que contiene suero de ternera fetal inactivado por calor 0,5% (FCS) cuando se compara con tal ensayo sin dicho anticuerpo tiene propiedades mejoradas en una terapia antitumoral.

ANTICUERPOS CONTRA EL RECEPTOR I DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE
TIPO INSULINICO Y USOS DE LOS MISMOS

Caso 21695

La presente invención se refiere a anticuerpos contra el receptor I del factor de crecimiento de tipo insulínico (IGF-IR), métodos para su producción, composiciones farmacéuticas conteniendo dichos anticuerpos, y usos de los mismos.

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

Los anticuerpos contra IGF-IR son bien conocidos en el campo de la investigación y son investigados por sus efectos antitumorales *in vitro* e *in vivo*. (Benini, S., et al., Clin. Cancer Res. 7 (2001) 1790-1797; Scotlandi, K., et al., Cancer Gene Ther. 9 (2002) 296-307; Scotlandi, K., et al., Int. J. Cancer 101 (2002) 11-16; Brunetti, A., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 165 (1989) 212-218; Prigent,

56

S.A., et al., J. Biol. Chem. 265 (1990) 9970-9977; Li, S.L., et al., Cancer Immunol. Immunother. 49 (2000) 243-252; Pessino, A., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 162 (1989) 1236-1243; Surinya, K.H., et al., J. Biol. Chem. 277 (2002) 16718-16725; Soos, M.A., et al., J. Biol. Chem., 267 (1992) 12955-12963; Soos, M.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 5217-5221; O'Brien, R.M., et al., EMBO J. 6 (1987) 4003-4010; Taylor, R., et al., Biochem. J. 242 (1987) 123-129; Soos, M.A., et al., Biochem. J. 235 (1986) 199-208; Li, S.L., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 196 (1993) 92-98; Delafontaine, P., et al., J. Mol. Cell. Cardiol. 26 (1994) 1659-1673; Kull, F.C. Jr., et al. J. Biol. Chem. 258 (1983) 6561-6566; Morgan, D.O., y Roth, R.A., Biochemistry 25 (1986) 1364-1371; Forsayeth, J.R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 3448-3451; Schaefer, E.M., et al., J. Biol. Chem. 265 (1990) 13248-13253; Gustafson, T.A., y Rutter, W.J., J. Biol. Chem. 265 (1990) 18663-18667; Hoyne, P.A., et al., FEBS Lett. 469 (2000) 57-60; Tulloch, P.A., et al., J. Struct. Biol. 125 (1999) 11-18; Rohlik, Q.T., et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 149 (1987) 276-281; y Kalebic, T., et al., Cancer Res. 54 (1994) 5531-5534; Adams, T. E., et al., Cell. Mol. Life Sci. 57 (2000) 1050-1063; Dricu, A., et al., Glycobiology 9 (1999) 571-579; Kanter-Lewensohn, L., et al., Melanoma Res. 8 (1998) 389-397; Li, S.L., et al., Cancer Immunol. Immunother. 49 (2000) 243-252). Los anticuerpos contra IGF-IR are también se describen en muchas otras publicaciones, por ejemplo, Arteaga, C.L., et al., Breast Cancer Res. Treat-

59

57

ment 22 (1992) 101-106; y Hailey, J., et al., Mol. Cancer Ther. 1 (2002) 1349-1353.

En particular, el anticuerpo monoclonal contra IGF-IR denominado α IR3 se utiliza ampliamente en la investigación del estudio de los procedimientos mediados por IGF-IR y enfermedades mediadas por IGF-I tales como cáncer. Alpha-IR-3 fue descrito por Kull, F.C., J. Biol. Chem. 258 (1983) 6561-6566. Mientras tanto, unas cien publicaciones han sido publicadas tratando la investigación y el uso terapéutico de α IR3 respecto a su efecto antitumoral, por separado y juntamente con agentes citostáticos tales como doxorubicina y vincristina. El α IR3 es un anticuerpo monoclonal de ratones que es conocido por inhibir la unión de IGF-I al receptor IGF pero no la unión de IGF-II a IGF-IR. El α IR3 a elevadas concentraciones estimula la proliferación de células tumorales y la fosforilación del IGF-IR (Bergmann, U., et al., Cancer Res. 55 (1995) 2007-2011; Kato, H., et al., J. Biol. Chem. 268 (1993) 2655-2661). Existen otros anticuerpos (por ejemplo, 1H7, Li, S.L., et al., Cancer Immunol. Immunother. 49 (2000) 243-252) que inhiben la unión de IGF-II a IGF-IR de una manera más potente que la unión a IGF-I. Un resumen del contexto de la invención de anticuerpos y sus propiedades y características se describe por Adams, T.E., et al., Cell. Mol. Life Sci. 57 (2000) 1050-1063.

La mayoría de los anticuerpos descritos en el contexto de la invención son de origen murino. Tales anticuerpos no son útiles, tal como se conoce en el contexto de la invención, para la terapia de pacientes humanos sin más altera-

ciones como la quimerización o humanización. Basándonos en estos inconvenientes, los anticuerpos humanos son claramente preferidos como agentes terapéuticos en el tratamiento de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos son bien conocidos en el contexto de la invención (van Dijk, M.A., y van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Pharmacol. 5 (2001) 368-374). Basándonos en tal tecnología, se pueden producir anticuerpos humanos contra una gran variedad de dianas. Ejemplos de anticuerpos humanos contra IGF-IR se describen en WO 02/053596.

Sin embargo, aún existe una necesidad de anticuerpos contra IGF-IR con beneficios convincentes para pacientes con necesidad de terapia antitumoral. El beneficio relevante para el paciente es, en términos simples, la reducción del crecimiento tumoral y una prolongación significativa del tiempo de progresión causado por el tratamiento con el agente antitumorogénico.

Resumen de la Invención

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

a) es del isotipo IgG1,

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

c) inhibe en al menos un 80%, preferiblemente al menos en un 90%, a una concentración de 5 nM la fosforilación de IGF-IR en un ensayo de fosforilación celular utilizando

59

células HT29 en un medio conteniendo un 0.5% de suero de feto de ternera inactivado por calor (FCS) cuando se compara con tal ensayo sin dicho anticuerpo, y

5 d) no muestra actividad estimuladora de IGF-IR medida como fosforilación pK_B a una concentración de 10 μ M en un ensayo de fosforilación celular utilizando células 3T3 proporcionando de 400.000 a 600.000 moléculas IGF-IR por célula en un medio que contiene un 0.5% de suero de feto de ternera inactivado por calor (FCS) cuando se compara
10 con tal ensayo sin dicho anticuerpo.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención muestran beneficios para los pacientes que necesitan una terapia antitumoral y proporcionan reducción del crecimiento tumoral y una prolongación significativa en el tiempo de progresión.
15 Los anticuerpos de acuerdo con la invención tiene nuevas y creativas propiedades causando un beneficio para un paciente que sufre una enfermedad asociada con la desregulación de IGF, especialmente una enfermedad tumoral. Los anticuerpos de acuerdo con la invención están caracterizados
20 por las propiedades anteriormente mencionadas. Las propiedades son por lo tanto especialmente específicas para la unión a IGF-IR, la inhibición de la unión de IGF-I e IGF-II a IGF-IR en la proporción anteriormente mencionada, siendo del isotipo IgG1, y no activando la señalización de IGF-IR
25 incluso en células de sobreexpresión IGF-IR en una concentración 200 veces superior a su valor CI₅₀. Los anticuerpos que no tienen "actividad mimética IGF-I" aportan una fuerte ventaja cuando se utilizan como agentes terapéuticos.

62

Preferiblemente, un anticuerpo de acuerdo con la invención adicionalmente induce la muerte celular del 20% de las células o más de una preparación de células expresando IGF-IR tras 24 horas a una concentración de dicho anticuerpo de 100 nM por ADCC.

Preferiblemente, además, los anticuerpos de acuerdo con la invención inducen la muerte celular del 20% o más células de una preparación de células expresando IGF-IR después de 4 horas a una concentración de dicho anticuerpo de 100 nM por CDC.

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

La invención también comprende ácidos nucleicos. Los polipéptidos codificados son capaces de unirse juntamente con las otras cadenas respectivas de anticuerpos definidas seguidamente:

- a) una cadena pesada de anticuerpo comprendiendo como CDRs CDR1 (aa 31-35), CDR2 (aa 50-66) y CDR3 (aa 99-107) de ID de SEC N°:1 ó 3;
- b) una cadena ligera de anticuerpo comprendiendo como CDRs CDR1 (aa 24-34), CDR2 (aa 50-56) y CDR3 (aa 89-98) de ID de SEC N°:2 ó 4.

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

61

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

El anticuerpo es además caracterizado por una afinidad de 10^{-9} M (K_D) o menor, preferiblemente de 10^{-9} a 10^{-13} M.

5 El anticuerpo muestra preferiblemente inhibición dependiente de concentración no detectable de unión de IGF-II al receptor.

Preferiblemente, la invención proporciona anticuerpos que comprenden como regiones determinantes complementarias
10 (CDRs) teniendo las siguientes secuencias:

a) una cadena pesada de anticuerpo comprendiendo como CDRs CDR1 (aa 31-35), CDR2 (aa 50-66) y CDR3 (aa 99-107) de ID de SEC N°:1 ó 3;

b) una cadena ligera de anticuerpo comprendiendo como CDRs
15 CDR1 (aa 24-34), CDR2 (aa 50-56) y CDR3 (aa 89-98) de ID de SEC N°:2 ó 4.

El anticuerpo es preferiblemente del tipo IgG1 y por lo tanto proporciona unión al complemento Clq e induce CDC. El anticuerpo es además caracterizado por la capacidad de
20 unión del receptor IgGFc y de inducir ADCC.

El anticuerpo de acuerdo con la invención prolonga considerablemente el tiempo de progresión en modelos tumorales de injertos heterólogos relevantes en comparación con animales tratados con el vehículo y reduce el crecimiento
25 tumoral. El anticuerpo inhibe la unión de IGF-I y IGF-II a IGF-IR *in vitro* e *in vivo*, preferiblemente de una manera similar para IGF-I e IGF-II.

La invención además proporciona líneas celulares

64

hibridoma que producen tales anticuerpos monoclonales antagonísticos de acuerdo con la invención.

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

Línea Celular	N° de depósito	Fecha de depósito
<IGF-1R> HUMAB-Clon 18	DSM ACC 2587	10.04.2003
<IGF-1R> HUMAB-Clon 22	DSM ACC 2594	09.05.2003

Los anticuerpos que obtenidos de dichas líneas celulares son realizaciones preferidas de la invención.

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

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

La invención además proporciona métodos para el tratamiento del cáncer, comprendiendo la administración a un paciente diagnosticado de cáncer (y por lo tanto que está en necesidad de una terapia antitumoral) una cantidad efectiva
20 de un anticuerpo antagonista contra IGF-IR de acuerdo con la invención. El anticuerpo puede ser administrado sólo, en una composición farmacéutica, o alternativamente en combinación con un tratamiento citotóxico tal como radioterapia o un agente citotóxico o un pro-fármaco del mismo.

25 La invención además comprende el uso de un anticuerpo

de acuerdo con la invención para el tratamiento de cáncer y para la elaboración de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención. Además, la invención comprende un método para la elaboración de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención.

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

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

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

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

La invención además comprende un método para la producción de un anticuerpo humano recombinante de acuerdo con la invención, caracterizado por la expresión de un ácido nucleico de acuerdo con la invención en una célula huésped procariota o eucariota y recuperar dicho anticuerpo de dicha célula. La invención además comprende el anticuerpo ob-

64

tenible mediante tal método recombinante.

La invención además comprende un método para la selección de un anticuerpo contra IGF-IR a partir de una pluralidad de anticuerpos contra IGF-IR caracterizados en que se
5 realiza un ensayo de fosforilación celular usando células 3T3 proporcionando de 400.000 a 600.000 moléculas IGF-IR por célula en un medio que contiene 0,5% de suero de feto de ternera inactivado por calor (FCS) con dichos anticuerpos, y dicho anticuerpo se selecciona el que no muestra actividad estimulante IGF-IR medida como fosforilación pK_B a
10 una concentración de 10 μ M cuando se compara con tal ensayo sin dicho anticuerpo. Preferiblemente el anticuerpo tiene una o más de las propiedades anteriormente mencionadas.

La invención además comprende un método para la preparación de una composición farmacéutica caracterizada en seleccionar un anticuerpo contra IGF-IR a partir de una pluralidad de anticuerpos contra IGF-IR realizando un ensayo de fosforilación celular utilizando células 3T3 proporcionando de 400.000 a 600.000 moléculas IGF-IR por células en
15 un medio conteniendo un 0,5% de suero de feto de ternera inactivado por calor (FCS) con dichos anticuerpos y seleccionando dicho anticuerpo que no muestra actividad estimulante IGF-IR medida como fosforilación pK_B a una concentración de 10 μ M cuando se compara con tal ensayo sin dicho anticuerpo, produciendo dicho anticuerpo mediante expresión recombinante, recuperando dicho anticuerpo y combinando dicho anticuerpo con un tampón y/o adyuvante farmacéuticamente
20 aceptables. Preferiblemente el anticuerpo tiene una o

67

65

más de las propiedades adicionales anteriormente mencionadas.

Descripción detallada de la Invención

5 El término "anticuerpo" abarca varias formas de anticuerpos incluyendo pero no limitándose a anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos diseñados genéticamente siempre que las propiedades características de acuerdo con la invención se mantengan.

10 Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de anticuerpos de longitud completa, generalmente al menos la porción de unión al antígeno o la región variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen di-
15 anticuerpos, moléculas de anticuerpo de cadena simple, inmunotoxinas, y anticuerpos multi-específicos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Además, los fragmentos de anticuerpos comprende polipéptidos de cadena única que tienen las características de una cadena VH, particularmente siendo capaces de unirse juntamente con una cadena VL o
20 una cadena VL unida a IGF-1R, particularmente siendo capaces de unirse juntamente con una cadena VH a un bolsillo de unión de antígeno funcional y allí proporcionar la propiedad de inhibición de la unión de IGF-1 e IGF-II a IGF-IR.

25 "Fragmentos de anticuerpos" también comprende tales fragmentos que por ellos mismos no son capaces de proporcionar funciones efectoras (ADCC/CDC) pero proporcionan esta función de una manera de acuerdo con la invención después de ser combinados con dominio(s) constantes de anti-

68

66

cuerpos apropiados.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" tal como se utilizan aquí se refieren a la preparación de moléculas de anticuerpos de una composición de aminoácidos única. Consecuentemente, el término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos exhibiendo una única especificidad de unión que tiene regiones constantes y variables derivadas a partir de secuencias de inmunoglobulinas de líneas germinales humanas.

En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido a partir de un animal no humano transgénico, por ejemplo un ratón transgénico, teniendo un genoma que comprende una cadena pesada humana transgénica y una cadena humana ligera transgénica fusionadas en una célula inmortalizada.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable, esto es, región de unión, de una fuente o especies y al menos una porción de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, normalmente preparada mediante técnicas de DNA recombinante. Los anticuerpos quiméricos comprenden una región murina variable y una región constante humana son especialmente preferidas. Tales anticuerpos quiméricos ratón/humano son el producto de genes inmunoglobulínicos expresados que comprenden segmentos de DNA codificando regiones variables inmunoglobulínicas de ratón y segmentos de DNA que codifican regiones constantes inmunoglo-

69

67

bulínicas humanas. Otras formas de "anticuerpos quiméricos" abarcados por la presente invención son aquellos en los que la clase o subclase ha sido modificada o cambiada a partir del anticuerpo original. Tales anticuerpos "quiméricos" son también referidos como "anticuerpos de clase conmutada". Los métodos para la producción de anticuerpos quiméricos implican DNA recombinante convencional y técnicas de transfección de genes ahora bien conocidas en este campo. Véase, por ejemplo, Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; Patentes EEUU N°. 5.202.238 y 5.204.244.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los que su armazón o "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR) han sido modificadas para comprender el CDR de una inmunoglobulina de especificidad diferente comparada con de la inmunoglobina parental. En una realización preferida, un CDR de ratón se injerta en la estructura de un anticuerpo humano para preparar el "anticuerpo humanizado". Véase, por ejemplo, Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327; y Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270. Los CDR particularmente preferidos se corresponden con aquellos que representan secuencias que reconocen los antígenos anotados anteriormente para anticuerpos bifuncionales y quiméricos.

El término "anticuerpo humano", tal como se utiliza aquí, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de las secuencias inmunoglobulínicas de líneas germinales humanas. La cadena pesada

68

variable deriva preferiblemente de la secuencia de la línea germinal DP-50 (GenBank L06618) y la cadena ligera variable preferiblemente deriva de la secuencia de la línea germinal L6 (GenBank X01668). Las regiones constantes del anticuerpo son regiones constantes del tipo IgG1 humano. Tales regiones pueden ser alotípicas y están descritas por, por ejemplo, Johnson, G., y Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218 y las bases de datos referenciadas aquí y son útiles siempre y cuando las propiedades de inducción de ADCC y preferiblemente CDC se conserven de acuerdo con la invención.

El término "anticuerpo humano recombinante", tal como se utiliza aquí, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que son preparados, expresados, creados o aislados mediante métodos recombinantes, tales como anticuerpos aislados a partir de una célula huésped tal como una célula SP2-0, NS0 ó CHO o a partir de un animal (por ejemplo un ratón) que es un transgénico para genes o anticuerpos inmunoglobulínicos humanos expresados utilizando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped. Tales anticuerpos humanos recombinantes tiene regiones variables y constantes derivadas de secuencias inmunoglobulínicas de una línea germinal humana en una forma reconfigurada. Los anticuerpos humanos recombinantes de acuerdo con la invención han sido sometidos a hipermutación somática in vivo. Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque están derivadas de y relacionadas con

71

las secuencias VL y VH de la línea germinal humana, no pueden existir naturalmente en el repertorio de la línea germinal del anticuerpo humano in vivo.

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

10 El término "molécula de ácido nucleico", tal como se utiliza aquí, pretende incluir moléculas de DNA y moléculas de RNA. Una molécula de ácido nucleico puede ser de una hebra o doble hebra, pero preferiblemente es un DNA de doble hebra.

15 Los "dominios constantes" no están implicados directamente en la unión del anticuerpo a un antígeno pero están implicados en funciones del efector (ADCC, unión al complemento; y CDC). El dominio constante de un anticuerpo de acuerdo con la invención es del tipo IgG1. Los dominios constantes humanos que tienen estas características están descritos en detalle por Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991),
20 y por Brüggemann, M., et al., J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361; Love, T.W., et al., Methods Enzymol. 178 (1989) 515-527. Los ejemplos se muestran en ID de SEC N°:5 a 8. Otros dominios constantes preferidos y útiles son los dominios
25 constantes de los anticuerpos obtenibles a partir de las líneas celulares hibridoma depositadas con DSMZ para esta invención. Los dominios constantes útiles en esta invención proporcionan unión al complemento. ADCC y opcionalmente CDC

70

son proporcionados por la combinación de dominios variables y constantes.

La "región variable" (región variable de una cadena ligera (VL), región variable de una cadena pesada (VH)) tal como se utiliza aquí designa cada uno de los pares de cadenas pesadas y ligeras que está implicado directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Los dominios de cadenas pesadas y ligeras humanas variables tienen la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones estructurales (FR) cuyas secuencias están ampliamente conservadas, conectadas mediante tres "regiones hipervariables" (o regiones que determinan la complementariedad, CDRs). Las regiones estructurales adoptan la configuración en lámina β y los CDRs pueden formar lazos que conectan la estructura lámina β . Los CDRs en cada cadena están sostenidos en su estructura tridimensional mediante las regiones estructurales y forman junto con los CDRs de la otra cadena el sitio de unión del antígeno. Las regiones CDR3 de la cadena ligera y pesada del anticuerpo juegan un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de la unión de los anticuerpos de acuerdo con la invención y por lo tanto proporcionan un objeto adicional de la invención.

Los términos "región hipervariable" o "porción de unión a un antígeno de un anticuerpo" cuando se utiliza aquí se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión del antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácido a partir de "regiones determinantes de la complementariedad"

71

o "CDRs". Las regiones "estructurales" o "FR" son aquellas otras regiones de dominios variables que no los residuos de regiones hipervariables tal como se definen aquí. Por lo tanto, las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo comprenden desde N- a C-terminal los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, y FR4. Especialmente, el CDR3 de la cadena pesada es la región que contribuye más a la unión del antígeno. Las regiones CDR y FR se determinan de acuerdo con la definición estándar de Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos residuos de un "lazo hipervariable".

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

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

La unión de IGF-I y IGF-II a IGF-IR es también inhibida por los anticuerpos de acuerdo con esta invención. La

74

72

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

El término "inhibición de la unión de IGF-I e IGF-II a IGF-IR" tal como se utiliza aquí se refiere a la inhibición de la unión de IGF-I o IGF-II marcados con I^{125} a IGF-IR presentados en la superficie de células tumorales HT29 (ATCC HTB-38) en un ensayo *in vitro*. Inhibir significa un valor CI_{50} de 2 nM o inferior.

El término "células que expresan IGF-IR" se refiere a tales células que sobre-expresan el receptor IGF-I en al menos 20.000 receptores/ célula. Tales células son, por ejemplo, líneas celulares tumorales tales como NCI H322M o HT29, o una línea celular (por ejemplo, 3T3 ATCC CRL1658) sobreexpresando IGF-IR después de la transfección con un vector de expresión para IGF-IR. La cantidad de receptores por célula se mide de acuerdo con Lammers et al EMBO J, 8

75

73

(1989) 1369-1375.

El término "inhibición de la fosforilación IGF-IR" se refiere al ensayo de fosforilación utilizando las células 3T3 proporcionando de 400.000 a 600.000 moléculas IGF-IR por célula en un medio que contiene un 0,5% de suero de feto de ternera inactivado por calor (FCS) cuando se compara con dicho ensayo sin dicho anticuerpo. La fosforilación se detecta mediante Western Blot utilizando un anticuerpo específico para proteínas tirosin-fosforiladas. Tal ensayo está descrito en el Ejemplo 11. La inactivación por calor de FCS se realiza calentando durante un corto periodo a 56 °C para la inactivación del sistema del complemento.

El término "inhibición de la fosforilación pKB" se refiere al ensayo de fosforilación utilizando las células 3T3 proporcionando de 400.000 a 600.000 moléculas IGF-IR por célula en un medio que contiene un 0,5% de suero de feto de ternera inactivado por calor (FCS) cuando se compara con tal ensayo sin dicho anticuerpo. La fosforilación se detecta mediante Western Blot utilizando un anticuerpo específico para pKB fosforilado a nivel de la serina 473 de pKB (Akt 1, Swiss Prot Acc. No. P31749). Tal ensayo se describe en el Ejemplo 11.

El término "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo" (ADCC) se refiere a la lisis de las células diana del tumor humano mediante un anticuerpo de acuerdo con la invención en la presencia de células efectoras. ADCC se mide preferiblemente mediante el tratamiento de una preparación de IGF-IR expresando células con un anticuerpo de

76

acuerdo con la invención en la presencia de células efectoras tales como PBMC aisladas frescas o células efectoras purificadas a partir de capas de leucocitos, como monocitos o células NK. ADCC se encuentra si el anticuerpo induce la lisis (muerte celular) a una concentración de 100 nM del 20% o más de las células tumorales después de 24 horas. Si se encuentra que el ADCC está más pronunciado a 4 horas que a 24 horas, entonces se mide a 4 horas. El ensayo se realiza preferiblemente con células tumorales marcadas ^{51}Cr o Eu y se realiza la medición del ^{51}Cr o Eu específicamente liberado. Los controles incluyen la incubación de las células tumorales diana con células efectoras pero sin el anticuerpo.

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

El término "inhibición completa de la transducción de

75

la señal mediada por IGF-I" se refiere a la inhibición de la fosforilación IGF-IR mediada por IGF-IR. Para tal ensayo, las células que expresan IGF-IR, preferiblemente células H322M, son estimuladas con IGF-I y tratadas con un anticuerpo de acuerdo con la invención una concentración de anticuerpos de 5 nM o superior es útil). A continuación, se realiza un PAGE SDS y se mide la fosforilación de IGF-IR mediante análisis Western Blott con un anticuerpo específico para tirosina fosforilada. La inhibición completa del señal de transducción se encuentra si en el Western Blot visiblemente no se puede detectar ninguna banda que se refiera a IGF-IR fosforilada.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención muestra una unión al mismo epítipo de IGF-IR como el anticuerpo 18 o están inhibidos en la unión a IGF-IR debido al impedimento estérico de la unión por el anticuerpo 18. La inhibición de la unión puede ser detectada mediante un ensayo SPR utilizando anticuerpo 18 inmovilizado e IGF-IR a una concentración de 20-50 nM y el anticuerpo a ser detectado a una concentración de 100 nM. Un señal de reducción del 50% o más muestra que el anticuerpo compite con el anticuerpo 18. Tal ensayo puede ser realizado de la misma manera mediante la utilización de anticuerpo 22 como un anticuerpo inmovilizado.

El término "epítipo" significa un determinante proteínico capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítopos normalmente consisten en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas tales como cadenas late-

78

rales de azúcares o aminoácidos y normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, también tienen características específicas de carga. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se diferencian en que la unión al anterior pero no al último se pierde en la presencia de solventes desnaturalizantes.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención incluyen, además, tales anticuerpos que tienen "modificaciones de secuencia conservativa", modificaciones de secuencias de aminoácidos y nucleótidos que no afectan ni alteran las características anteriormente mencionadas del anticuerpo de acuerdo con la invención. Las modificaciones se pueden introducir mediante técnicas estándar conocidas en el campo, tales como mutagénesis puntual dirigida y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen unas en las que el residuo de aminoácido es sustituido por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en el campo. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, iso-

27

leucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, un aminoácido no esencial precedido en un anticuerpo anti-IGF-IR puede ser sustituido preferiblemente con otro residuo de aminoácidos de la misma familia de cadena lateral.

Las sustituciones de aminoácidos puede ser realizadas mediante mutagénesis basada en el modelado molecular tal como está descrito por Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327 y Queen, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033.

En una realización preferida de la invención, los anticuerpos de acuerdo con la invención son caracterizados por una o más de las características seleccionadas del grupo seleccionado de los parámetros de unión k_a , k_d y K_D , uniéndose al mismo epítipo al que los anticuerpos 18 y 22 se unen, los valores de CI_{50} para la inhibición de la unión de IGF-I y IGF-II a IGF-IR en células tumorales, y los valores CI_{50} para la inhibición de la fosforilación de IGF-IR con baja estimulación de IGF-I en células tumorales. La inhibición de la fosforilación de IGF-IR lleva a la inhibición de la fosforilación de los elementos corriente abajo tales como pK_B , la regulación a la baja de IGF-IR en células tumorales, y la influencia en el crecimiento tridimensional de las células tumorales *in vitro*. Los anticuerpos son además preferiblemente caracterizados por sus valores farmacocinéticos y farmacodinámicos, y la reactividad cruzada por otras especies.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención inhiben la

8c

78

fosforilación IGF-IR de la tirosina y preferiblemente también la fosforilación pK_s de la tirosina en un grado similar.

5 Los anticuerpos de acuerdo con la invención preferiblemente regulan a la baja el nivel de la proteína IGF-IR en las células tumorales y en tumores, por ejemplo, en tumores injertos heterólogos.

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

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

20 Los anticuerpos de acuerdo con la invención son preferiblemente producidos con métodos recombinantes. Tales métodos son ampliamente conocidos en el contexto de la invención y comprenden la expresión de proteínas en células eucariotas y procariotas con el subsiguiente aislamiento del polipéptido del anticuerpo y normalmente la purificación a una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión
25 de las proteínas, los ácidos nucleicos que codifican cadenas pesadas y ligeras o fragmentos de las mismas son insertados en vectores de expresión mediante métodos estándar. La expresión se realiza en células huésped eucariotas o

81

79

procariotas adecuadas como células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, células P2/0, células HEK293, células COS, levaduras o células E. coli, y el anticuerpo se recupera de células (sobrenadante o células después de la lisis).

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

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

La expresión en células NS0 está descrita en, por ejemplo, Barnes, L.M., et al., Cytotechnology 32 (2000) 109-123; y Barnes, L.M., et al., Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261-270. La expresión transitoria está descrita en, por ejemplo, Durocher, Y., et al., Nucl. Acids. Res. 30 (2002)

80

E9. La clonación de los dominios variables está desrita por Orlandi, R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289; y Norderhaug, L., et al., J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87. Un sistema de expresión transitoria preferida (HEK 293) está descrita por Schlaeger, E.-J., y Christensen, K., en Cytotechnology 30 (1999) 71-83 y por Schlaeger, E.-J., en J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199.

10 Las secuencias control que son adecuadas para procariontas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, potenciadores y señales de poliadenilación.

15 El ácido nucleico está "unido operativamente" cuando está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el DNA para una presencia o líder secretorio está operativamente unido a un DNA para un polipéptido si éste se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia de codificación si ésta afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosomas está operativamente unido a una secuencia de codificación si ésta se posiciona de manera que facilite la traducción. Generalmente, "unido operativamente" significa que las secuencias de DNA que están unidas son contiguas, y en el caso de un líder de secreción, contiguas y en el marco de lectura. Sin

20

25

81

embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La union se lleva a cabo mediante la ligacion en sitios de restriccion convenientes. Si tales sitios no existen, los adaptadores de oligonucleotidos sinteticos o enlazantes se
5 utilizan de acuerdo con la practica convencional.

Los anticuerpos monoclonales se separan apropiadamente del medio de cultivo mediante procedimientos de purificacion inmunoglobulinica convencional tales como por ejemplo, proteina A-Sepharosa, cromatografia hidroxilapatita, elec-
10 troforesis en gel, diálisis, o cromatografia de afinidad. El DNA y RNA que codifican los anticuerpos monoclonales se aislan fácilmente y se secuencian utilizando procedimientos convencionales. Las células hibridoma pueden servir como una fuente de tales DNA y RNA. Una vez aislado, el DNA pue-
15 de ser insertado en vectores de expresion, que son entonces transfectados en células huésped tales como células HEK 293, células CHO, o células de mieloma que por otra parte no producen proteínas inmunoglobulinicas, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las
20 células huésped.

Las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano IGF-IR están preparados mediante la introduccion de cambios de nucleotidos apropiados en el DNA del anticuerpo, o mediante la síntesis de péptidos. Tales modificaciones pueden realizarse, sin embargo, sólo en un ámbito
25 muy limitado, por ejemplo tal como se describe anteriormente. Por ejemplo, las modificaciones no alteran las características del anticuerpo anteriormente mencionado tales como

42

el isotipo de IgG y el epítipo de unión, pero pueden mejorar el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad de proteínas o facilitar la purificación.

5 Cualquier residuo de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación correcta del anticuerpo anti-IGF-IR puede también estar sustituido, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir entrecruzamientos aberrantes. Inversamente, se pueden añadir enlace(s) de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

10 Otro tipo de variantes de aminoácidos del anticuerpo altera el modelo de glicosilación original del anticuerpo. Por alterar se entiende la eliminación de una o más de las fracciones de carbohidratos encontrados en el anticuerpo y/o añadiendo uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo. La glicosilación de los anticuerpos está normalmente N-ligada. N-ligada se refiere a la unión de la mitad del carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripéptido de asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencia de reconocimiento para la unión enzimática de la mitad del carbohidrato a la cadena lateral de la asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencia tripéptido en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se lleva a cabo convenientemente mediante la altera-

88

ción de la secuencia de aminoácidos de manera que contiene una o más de las secuencias tripeptido anteriormente descritas (para sitios de glicosilación N-ligados).

Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-IGF-IR se preparan mediante una variedad de métodos conocidos en el campo. Estos métodos incluyen, pero no están limitados a, aislamiento a partir de una fuente natural (en caso de variantes de secuencias de aminoácidos que ocurren naturalmente) o preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o mutagénesis dirigida a un sitio), mutagénesis PCR, y cartucho de mutagénesis de una variante preparada primeramente de una versión no variante de un anticuerpo anti-IGF-IR humanizado.

La invención también pertenece a inmunoconjugados que comprenden el anticuerpo de acuerdo con la invención conjugado a un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa originada a partir de bacterias, hongos, plantas o animales, o fragmentos de la misma), un isótopo radiactivo (por ejemplo, un radioconjugado) o un profármaco de un agente citotóxico. Los agentes útiles en la generación de tales inmunoconjugados han sido descritos anteriormente. Toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden ser utilizados incluyen la cadena A de la difteria, fragmentos activos de no unión de la toxina de la difteria, la cadena A de la exotosina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de resina, cadena A de abrina, cadena A

84

de modicina, alfa sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de la *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

Conjugados del anticuerpo y agente citotóxico se fabrican utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres; (tales como adipimidato dimetilo HCL), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como hexandiamina de bis-(p-azidobenzoilo)), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazonibenzoilo)etilenodiatnina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tioleno), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobencono). Por ejemplo, una inmu toxina de resina se puede preparar tal como se describe en Vitetta, E.S., et al., Science 238 (1987) 1098-1104). Ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildi-etileno triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ejemplo para la conjugación del radionucleótido al anticuerpo. Véase WO 94/11026.

Otro tipo de modificaciones covalentes implica el acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al anticuerpo. Estos procedimientos son ventajas en el hecho de que no necesitan la producción del anticuerpo en una célula huésped

87

45

que tenga capacidades de glicosilación para la glicosilación N- o O-ligada. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el azúcar puede unirse a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como aquellos de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como aquellos de serina, treonina, o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos, tales como aquellos de fenilalanina, tirosina, o triptófano, o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos están descritos en WO 87/05330, y en Aplin, J.D., y Wriston, J.C. Jr., CRC Crit. Rev. Biochem. (1981) 259-306.

La eliminación de cualquier fracción de carbohidrato presente en el anticuerpo puede ser llevada a cabo químicamente o enzimáticamente. La desglicosilación química requiere la exposición del anticuerpo al compuesto ácido trifluorometansulfónico, o a un compuesto equivalente. Este tratamiento resulta en la escisión de muchos o todos los azúcares exceptuando los azúcares unidos (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), a la vez que se deja el anticuerpo intacto. La desglicosilación química está descrita por Sojahr, H.T., y Bahl, O.P., Arch. Biochem. Biophys. 259 (1987) 52-57 y por Edge, A.S., et al. Anal. Biochem. 118 (1981) 131-137. La escisión enzimática de las fracciones de los carbohidratos en anticuerpos puede conseguirse mediante el uso de una variedad de endo- y exo- glicosidasas tal como está descrito por Thotakura, N.R., y Bahl, O.P., Meth. Enzymol. 138 (1987) 350-359.

Otro tipo de modificaciones covalentes del anticuerpo

88

46

comprenden la unión del anticuerpo a uno de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol, propilenglicol, o plialquilenos, en la manera publicada en la Patente de EEUU N°. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 5 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337.

Todavía en otro aspecto, la invención proporciona linfocitos B aislados a partir de un animal no humano transgénico, por ejemplo un ratón transgénico, que expresa los anticuerpos anti IGF-IR humanos de acuerdo con la invención.

10 Preferiblemente, los linfocitos B aislados se obtienen a partir de un animal no humano transgénico, por ejemplo un ratón transgénico, que ha sido inmunizado con una preparación purificada o enriquecida del antígeno IGF-IR y/o células que expresan IGF-IR. Preferiblemente, los animales no

15 humanos transgénicos, por ejemplo un ratón transgénico, tiene un genoma que comprende un transgen de la cadena pesada humana y un transgen de la cadena ligera humana que codifica todos o una porción de los anticuerpos de la invención. Los linfocitos B aislados entonces se immortalizan

20 para proporcionar una fuente de anticuerpos anti-IGF-IR humanos (por ejemplo, un hibridoma). Consecuentemente, la presente invención también proporciona un hibridoma capaz de producir anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con la invención. En una realización, el hibridoma incluye un

25 linfocito B obtenido a partir de animales no humanos transgénicos, por ejemplo, un ratón transgénico que tiene un genoma que comprende un transgen de cadena pesada humana y un transgen de cadena ligera humana codificando todo o una

89

87

porción de un anticuerpo de la invención, fusionadas con una célula inmortalizada.

En una realización particular, el animal transgénico no humano es un ratón transgénico que tiene un genoma que comprende un transgen de cadena pesada humana y un transgen de cadena ligera humana codificando todo o una porción de un anticuerpo de la invención. El animal no humano transgénico puede ser inmunizado con una preparación purificada o enriquecida de antígeno IGF-IR y/o células que expresan IGF-IR. Preferiblemente, el animal no humano transgénico, por ejemplo el ratón transgénico, es capaz de producir isotipos IgG1 de anticuerpos monoclonales a IGF-IR.

Los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención pueden estar producidos mediante la inmunización de un animal no humano transgénico, por ejemplo un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgen de cadena pesada humana y un transgen de cadena ligera humana codificando todo o una porción de un anticuerpo de la invención, con una preparación purificada o enriquecida de antígeno IGF-IR y/o células que expresan IGF-IR. Los linfocitos B (por ejemplo linfocitos B esplénicos) del animal se obtienen y se fusionan con células de mieloma para formar células hibridoma inmortales que secretan anticuerpos monoclonales humanos contra IGF-IR.

En una realización preferida, los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra IGF-IR pueden ser generados utilizando un ratón transgénico que lleva partes del sistema inmune humano en vez del sistema del ratón. Estos rato-

90

48

nes transgénicos, referidos aquí como ratones "HuMAb", contienen un gen inmunoglobulínico humano minilocus que codifica genes inmunoglobulínicos humanos no redispuestos que incluyen la cadena pesada (μ y γ) y la cadena ligera κ (genes de región constante), juntamente con las mutaciones di-

5 ana que inactivan los locus de las cadenas μ y κ endógenos (Lonberg, N., et al., Nature 368 (1994) 856-859). Consecuentemente, el ratón exhibe expresión reducida del ratón IgM o K, y en respuesta a la inmunización, los transgenes

10 de cadena ligera y pesada humana introducidos padecen un intercambio de clase y una mutación somática para generar los anticuerpos monoclonales IgG humanos de alta afinidad (Lonberg, N., et al., Nature 368 (1994) 856-859; revisado en Lonberg, N., Handbook of Experimental Pharmacology 113

15 (1994) 49-101; Lonberg, N., y Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. 25 (1995) 65-93; y Harding, F., y Lonberg, N., Ann. N. Acad. Sci 764 (1995) 536-546). La preparación del ratón HuMAb está descrita en Taylor, L., et al., Nucleic Acids Research 20 (1992) 6287-6295; Chen, J., et al., International Immunology 5 (1993) 647-656; Tuailon, N., et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 90 (1993) 3720-3724; Choi, T.K., et al., Nature Genetics 4 (1993) 117-123; Chen, J., et al., EMBO J. 12 (1993) 821-830; Tuailon, N., et al., Immunol. 152 (1994) 2912-2920; Lonberg, N., et al., Nature 368

20 (1994) 856-859; Lonberg, N., Handbook of Experimental Pharmacology 113 (1994) 49-101; Taylor, L., et al., Int. Immunol. 6 (1994) 579-591; Lonberg, N., y Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. 25 (1995) 65-93; Harding, F., y Lonberg, N.,

25

91

89

Ann. N. Acad. Sci 764 (1995) 536-546; Fishwild, D.M., et al., Nat. Biotechnol. 14 (1996) 845-851, los contenidos de todos éstos están aquí incorporados por referencia en su totalidad. Véase además, Patente EEUU N°. 5.545.806; 5 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; 5.545.807; 5.770.429; WO 98/24884; WO 94/25585; WO 93/1227; WO 92/22645; y WO 92/03918.

Para generar anticuerpos monoclonales humanos completos a IGF-IR, los ratones HuMAb puede ser inmunizado con una preparación purificada o enriquecida de antígenos IGF-IR y/o células que expresan IGF-IR de acuerdo con el método general, tal como se describe por Jonberg, N., et al., Nature 368 (1994) 856-859; Fishwild, D.M., et al., Nat. Biotechnol. 14 (1996) 845-851 y WO 98/24884. Preferiblemente, 10 el ratón tendrá de 6-16 semanas de edad en la primera inmunización. Por ejemplo, una preparación enriquecida o purificada de antígeno IGF-IR soluble (por ejemplo, purificada a partir de células que expresan IGF-IR) puede utilizarse para inmunizar el ratón HuMAb intraperitonealmente. En caso 20 de que la inmunización utilizando una preparación enriquecida o purificada del antígeno IGF-IR no resulte en anticuerpos, el ratón también puede ser inmunizado con células que expresen IGF-IR, por ejemplo, una línea celular tumoral, para promover respuestas inmunes. La experiencia acumulada con varios antígenos ha mostrado que el ratón transgénico HuMAb responde mejor cuando es inicialmente inmunizado intraperitonealmente (i.p.) con antígeno en un adyu-

90

vante de Freund completo, seguido por inmunizaciones i.p. cada semana (por ejemplo, hasta un total de 6) con antígeno en adyuvante de Freund incompleto. La respuesta inmune puede ser monitorizada durante el curso del protocolo de inmunización con muestras de plasma que son obtenidas a partir de sangre retroorbital. El plasma puede ser cribado por ELISA, y los ratones con suficientes titulaciones de inmunoglobulina humana anti-IGF-IR pueden ser usados para la inmortalización de los linfocitos B correspondientes. Los ratones pueden ser activados intravenosamente con antígeno de 3 a 4 días antes del sacrificio y la extracción del bazo y los nódulos linfáticos. Se espera que se puedan necesitar de 2 a 3 fusiones por cada antígeno para que pueda realizarse. Algunos ratones pueden ser inmunizados por cada antígeno. Por ejemplo, pueden inmunizarse un total de doce ratones HuMAb de las cepas HCo7 y HCo12.

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

Los ratones HCo12 tienen una disrupción JKD en sus genes de cadena ligera endógena (kappa) (tal como se describe en Chen, J., et al., EMBO J. 12 (1993) 821-830), una dis-

91

rupción CMB en sus genes de cadena pesada endógena (tal como se describe en el Ejemplo 1 de WO 01/14424), un transgen de cadena ligera kappa humano KCo5 (tal como se describe en Fishwild, D.M., et al., Nat. Biotechnol. 14 (1996) 845-851), y un transgen de cadena pesada humano HCo12 (tal como se describe en el Ejemplo 2 de WO 01/14424).

Los limfocitos de ratón pueden ser aislados y fusionados con líneas celulares de mieloma utilizando PEG basándonos en protocolos estándar para generar hibridomas. Los hibridomas resultantes son entonces cribados por la producción de anticuerpos específicos de antígenos. Por ejemplo, suspensiones celulares simples de linfocitos derivados del bazo y nódulos linfáticos de ratones inmunizados son fusionadas a un sexto del número de células mieloma de ratón no secretoras 2/0 SP (ATCC, CRL 1581) con un 50% de PEG. Las células se colocan en placas a aproximadamente 2×10^5 en placas microtituladas de fondo plano, seguido por unas dos semanas de incubación en medio selectivo.

Los pocillos individuales son cribados mediante ELISA para anticuerpos IgG e IgM monoclonales anti-IGF-IR humanos. Una vez que ocurre el crecimiento extensivo del hibridoma, se analiza el medio, normalmente después de 10-14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpos se vuelven a colocar en placas, se vuelven a cribar, y si todavía son positivos para IgG humana, los anticuerpos monoclonales anti-IGF-IR, pueden ser subclonados al menos dos veces limitando la dilución. Los subclones estables son entonces cultivados *in vitro* para producir anticuerpos en el medio de

94

92

cultivo del tejido para la caracterización.

Debido a que las secuencias CDR son las responsables de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes de acuerdo con la invención mediante construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias CDR de acuerdo con la invención en las secuencias estructurales a partir de diferentes anticuerpos humanos (ver, por ejemplo, Riechmann, L., et al., Nature 332 (1998) 323-327; Jones, P., et al., Nature 321 (1986) 522-525; y Queen, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86 (1989) 10029-10033). Tales secuencias estructurales se pueden obtener a partir de bases de datos de DNA públicas que incluyen secuencias de genes de anticuerpos humanos de línea germinal. Estas secuencias de línea germinal diferirán de las secuencias de genes de anticuerpos maduros porque no incluirán genes variables ensamblados completamente, que están formados por acoplamiento V(D)J durante la maduración de los linfocitos B. Las secuencias génicas de la línea germinal diferirán también de las secuencias de un repertorio de anticuerpos secundarios de alta afinidad en un individuo uniformemente a lo largo de la región variable.

La invención comprende preferiblemente un fragmento de ácido nucleico codificando un polipéptido unido a IGF-IR, por lo cual dicho polipéptido inhibe la unión de IGF-I y IGF-II a IGF-IR, seleccionado del grupo consistente en

a) una cadena pesada de anticuerpo comprendiendo como CDRs, CDR1 (aa 31-35), CDR2 (aa 50-66) y CDR3 (aa 99-107) de la ID de SEC N°:1 ó 3;

95

b) una cadena ligera de anticuerpo comprendiendo como CDRs, CDR1 (aa 24-34), CDR2 (aa 50-56) y CDR3 (aa 89-98) de la ID de SEC. N°: 2 ó 4.

5 Las regiones variables de cadenas ligeras y pesadas reconstruidas se combinan con secuencias de promotor, inicio de la traducción, región constante, 3' sin traducir, poliadenilación, y terminación de la transcripción para formar construcciones del vector de expresión. Las construcciones de expresión de cadena ligera y pesada pueden
10 combinarse en un vector simple, co-transfectarse, y transfectarse en serie, o transfectarse separadamente en células huésped que son entonces fusionadas para formar una célula huésped simple expresando ambas cadenas.

Consecuentemente, la invención proporciona un método
15 para la producción de un anticuerpo humano recombinante de acuerdo con la invención, caracterizada por la expresión de un ácido nucleico codificando

a) una cadena pesada de anticuerpo comprendiendo como CDRs, CDR1 (aa 31-35), CDR2 (aa 50-66) y CDR3 (aa 99-107) de
20 la ID de SEC N°:1 ó 3;

b) una cadena ligera de anticuerpo comprendiendo como CDRs, CDR1 (aa 24-34), CDR2 (aa 50-56) y CDR3 (aa 89-98) de la ID de SEC N°:2 ó 4.

La invención además comprende el uso de un anticuerpo
25 de acuerdo con la invención para el diagnóstico de IGF-IR in vitro, preferiblemente por un ensayo inmunológico determinando la unión entre IGF-IR de una muestra y el anticuerpo de acuerdo con la invención.

94

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo una composición farmacéutica, conteniendo un o una combinación de anticuerpos monoclonales humanos, o la porción de unión al antígeno del mismo, de la presente invención, formulada junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

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

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

El término "agente citotóxico" tal como se utiliza aquí se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o causa destrucción de células. El término pretende incluir isótopos radioactivos, agentes quimioterapéuticos, y toxinas tal como toxinas enzimática-

97

95

mente activas de hongos de origen bacteriano, de plantas o animales, o fragmentos de los mismos.

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

Tal como se utiliza aquí, "vehículo farmacéuticamente

98

96

aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, cubiertas, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retrasadores de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles.

5 Preferiblemente, el vehículo es adecuado para una administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (p.ej. por inyección o infusión).

Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que mantiene la actividad biológica deseada del anti-
10 cuerpo y no produce ningún efecto toxicológico no deseado (ver por ejemplo Berge, S.M., et al., J. Pharm. Sci. 66 (1977) 1-19). Tales sales se incluyen en la invención. Ejemplos de tales sales incluyen sales de adición ácida y sales de adición básica. Las sales de adición ácida incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos,
15 tales como sales de clorhídrico.

Una composición de la presente invención se puede administrar mediante una variedad de métodos conocidos en el arte. Tal como se puede apreciar por los entendidos en el
20 campo, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados.

Para administrar un compuesto de la invención mediante ciertas vías de administración, puede ser necesario cubrir el compuesto con, o co-administrar el compuesto con, un material para prevenir su inactivación. Por ejemplo, el compuesto se puede administrar a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones
25

97

salinas y soluciones de tampones acuosos.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o soluciones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas conocidas en el campo.

Las frases "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" tal como se utiliza aquí indican otros modos de administración que no sean la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyectables, e incluye, sin limitación, inyecciones o infusiones vía intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidal, intraspinal, epidural e intraesternal.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede asegurarse tanto mediante procedimientos de esterilización, supra, como por la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, paraben, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. Puede ser también deseable para incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico, y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de las formas farmacéuticas inyectables puede conllevar a

100

98

la inclusión de agentes que retrasan la absorción tal como monoestearato de aluminio y gelatina.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que se pueden usar de una forma hidratada apropiada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por aquellos entendidos en el campo.

Los niveles de dosis reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser variados de modo que se obtiene una cantidad de ingrediente activo que es efectiva para obtener la respuesta terapéutica deseada para un paciente en particular, composición, y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosis seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleada, o el éster, sal o amida de los mismos, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción de un compuesto en particular a ser empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historial de medicación anterior del paciente a tratar, y factores similares bien conocidos en las artes médicas.

La composición debe ser estéril y fluida para posibi-

101

99

litar que esta composición sea distribuible mediante una jeringa. Además de agua, el vehículo puede ser una solución salina tamponada isotónica, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos.

Se puede mantener una fluidez apropiada, por ejemplo, usando una cubierta tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de surfactantes. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro sódico en la composición. La absorción a largo término de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

Los siguientes ejemplos, referencias, listado de secuencias y figuras se proporcionan para ayudar al entendimiento de la presente invención, el verdadero alcance de la cual se lista en las siguientes reivindicaciones indexadas. Se sobreentiende que las modificaciones se pueden hacer en procedimientos listados sin desviarse del espíritu de la invención.

Descripción del Listado de Secuencias

ID de SEC N°: 1-4 Secuencias de amino y nucleótido de dominios de regiones variables ligeros y pesados de los anticuerpos 18 y 22

ID de SEC N°: 5 y 6 Secuencias de amino y nucleótido de dominios de regiones constantes humanas

102

100

Descripción de las Figuras

- Figura 1** Expresión en superficie de IGF-IR en cultivos celulares de baja y alta densidad.
- 5 **Figura 2** Ensayo WST (células NCI H322M) para la inhibición de la proliferación en cultivos 3D.
- Figura 3** Ensayo de formación de colonias para la inhibición de la proliferación en cultivos 3D (descripción microscópica).
- 10 **Figura 4** Ensayo de formación de colonias para la inhibición de la proliferación en cultivos 3D (cuantificación). ctr= control; Cl 18= anticuerpo 18.
- Figura 5** Inhibición de I^{125} -IGF-I unido a células HT29 mediante los anticuerpos 18 y 22 (valores CI_{50}).
- 15 **Figura 6** Inhibición de I^{125} -IGF-II unido a células HT29 por el anticuerpo 18.
- Figura 7** Inhibición de I^{125} -IGF-II unido a células HT29 por el anticuerpo α IR3.
- Figura 8** Bloqueo de la fosforilación inducida por IGF-I de ambos IGF-IR y Akt/PkB.
- 20 **Figura 9** Ninguna inhibición de I^{125} -insulina unida a células 3T3-IR mediante anticuerpos anti-hIGF-1R. (MAX a/o Ab: máxima unión de I^{125} -insulina; MIN: mínima unión tras la competición con insulina 1 μ M)
- 25 **Figura 10** Ningunas actividades estimulantes de AK18 en células 3T3 sobreexpresando IGF-IR.
- Figura 11** Ningunas actividades estimulantes de AK18 en células tumorales humanas (HT29).

103

101

Figura 12 Regulación a la baja de IGF-IR expuesta en la superficie celular H322N por el anticuerpo 18 in vitro.

Figura 13 Tratamiento con AK18, volumen tumoral primario

5 **Figura 14** Tratamiento con AK18 con o sin gemcitabina

Figura 15 Tratamiento con AK18, volumen tumoral primario

Ejemplo 1

Generación de una línea celular de hibridoma productora de anticuerpos anti-IGF-IR

10 **Cultivo de hibridomas**

Los hibridomas HuMAb generados se cultivaron en Medio de Expresión de Hibridomas (PAA Laboratories GmbH, Austria) complementados con 2 mM de L-glutamina (BioWhittaker) y 4% Factor de Clonación de Origen (Igen, Francia) a 37°C y 5%
15 CO₂.

Procedimiento de Inmunización de ratones transgénicos

Diez ratones transgénicos HCo7 (4 machos y 6 hembras), cepa GG2201 (Medarex, San José, CA, USA) se inmunizaron alternativamente con 1×10^6 células NIH 3T3, se transfectaron
20 con un vector de expresión para IGF-IR, y 20 µg de dominio extracelular soluble de IGF-IR. Se realizaron seis inmunizaciones en total, tres inmunizaciones intraperitoneales (IP) con las células que expresaban IGF-IR y tres inmunizaciones subcutáneas (SC) en la base de la cola con proteína recombinante. Para la primera inmunización, 100 µl de 1×10^6
25 células NIH 3T3 IGF-IR se mezclaron con 100 µl de adyuvante completo de Freund (CFA; Difco Laboratories, Detroit, USA). Para todas las otras inmunizaciones, 100 µl de células en

104

PBS se usaron o se mezcló proteína recombinante con 100 µl de adyuvante incompleto de Freund (ICFA; Difco).

ELISA específico de antígenos

Las titulaciones Anti-IGF-1R en suero de ratones inmunizados se determinaron mediante un ELISA específico de antígeno. El dominio extracelular soluble IGF-1R se cubrió a una concentración de 1 µg/ml en PBS durante toda la noche a 4°C, o durante dos horas a 37°C, en placas de 96 pocillos. Más tarde, los pocillos se bloquearon con PBSTC (PBS suplementado con 0,05% Tween®-20 y 2% de suero de pollo (Gibco BRL)) durante 1 hora (h) a temperatura ambiente. El suero de la primera toma se diluyó 1/50 en PBSTC, el suero de las otras tomas se pre-diluyó 1/100 en PBSTC y se diluyó en serie hasta 1/6400. Los sueros diluidos se añadieron a los pocillos y se incubaron durante 1 h a 37°C. El suero Pre-toma se usó como control negativo. 200 ng/ml de IGF-1R anti-humano de cabra (100 µg/ml) se usaron como control positivo. A continuación, las placas se lavaron dos veces con PBST y se incubaron con peroxidasa de rábano picante (HRP)-conjugada con IgG F(ab')₂ antihumana de rata (DAKO), se diluyó 1/2000 en PBSTC durante 1 h a 37°C. Los pocillos se lavaron dos veces con PBST y los ensayos se desarrollaron con una solución ABTS® preparada en fresco (1 mg/ml) (ABTS: 2,2'-azino bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA) en la oscuridad. La absorbancia se midió a 405 nm.

Análisis FACS

Además para la determinación mediante un ELISA especí-

fico de antígeno, las titulaciones anti-IGF-IR en el suero de los ratones inmunizados también se determinaron por análisis FACS. Las células NIH 3T3 IGF-IR y las células NIH 3T3 IGF-IR no transfectadas se incubaron con suero diluido durante 30 minutos a 4°C. El suero pre-toma se usó como control negativo. Inicialmente, 200 ng/ml de IGF-IR anti-humano de cabra se usaron como control positivo. Las células se lavaron tres veces en PBS suplementado con albúmina de suero bovino 1% y 0,01% de azida. A continuación, las células se incubaron con fluoresceína isotiocianato (FITC)-conjugado con fragmentos (F(ab')₂ de fragmentos de unión a antígeno) de IgG humana anti-humana de rata diluida 1/100 en tampón FACS, durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron dos veces en tampón FACS y las muestras se analizaron en un FACSCalibur (Becton Dickinson, Erembodegem-Aalst, Bélgica).

Promoción de los ratones

Cuando se encontró que las titulaciones séricas de anti-IGF-IR eran suficientes, los ratones fueron adicionalmente promovidos dos veces con 15 µg de dominio extracelular IGF-IR en 200 µl de PBS intravenosamente (i.v.) 4 y 3 días antes de la fusión.

Generación del Híbrido

Los ratones se sacrificaron y se extrajeron el bazo y los nodos linfáticos que flanqueaban la aorta abdominal y la vena cava. La fusión de los esplenocitos y las células de los nodos linfáticos con el patrón de fusión SP 2.0 se realizó de acuerdo con procedimientos operativos estándar.

104

κ-ELISA

Para determinar si los hibridomas que resultaron de la fusión generaban anticuerpos humanos, se realizó un κ-ELISA. Las placas ELISA se cubrieron con anticuerpos de cadena ligera κ de IgG anti-humana de rata (DAKO) diluidas 1/10000 en PBS mediante incubación durante toda la noche a 4°C. Tras descartar los pocillos, las placas se bloquearon por incubación con PBSTC durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, los pocillos se incubaron con sobrenadante del cultivo de hibridoma, se diluyeron a 1/2 en PBSTC. El medio de cultivo diluido a 1/2 en PBSTC se usó como control negativo, el suero de ratones κ-ligera positivos diluido 1/100 en PBSTC sirvió como control positivo. A continuación, los pocillos se lavaron tres veces y se incubaron con F(ab')₂ IgG anti-humana de rata HRP-conjugada (DAKO), diluida 1/2000 en PBSTC durante 1 h a 37°C. Los pocillos se lavaron tres veces y los ensayos se desarrollaron con una solución ABTS[™] preparada en fresco (1 mg/ml) durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA) en la oscuridad. La absorbancia se midió a 405 nm en un lector de placas ELISA.

Se prepararon los anticuerpos monoclonales 18 y 22.

Ejemplo 2

Determinación de la afinidad de los anticuerpos anti-IGF-IR por IGF-IR

Instrumento: BIACORE[®] 3000
Chip: CM5
Acoplamiento: acoplamiento amina
Tampón: HBS (HEPES, NaCl), pH 7,4, 25°C

107

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

Tabla 1:

Datos de Afinidad medidos por SPR (BIAcore® 3000)

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

Ejemplo 3

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

Materiales y Métodos:

Las células NCI H322M se cultivaron en medio RPMI en superficies de cubierta de vidrio de grado óptico tanto a baja densidad o a super-confluencia para estudiar los efectos en la expresión de superficie IGF-IR. En paralelo, el tejido injertado heterólogo H322M aislado del grupo de control (ratones sin tratar) se congeló por shock en isopentano y se cortaron crio-secciones de 5µm de grosor. El marcaje por inmunofluorescencia se realizó usando un anticuerpo monoclonal anti IGF-IR de ratón (αIR3, 5µg/ml) o un anti-

106

cuerpo de acuerdo con la invención, seguido de un anticuerpo anti-ratón de cabra o un anticuerpo anti-ratón de cabra marcado con Cy3 (Amersham Biosciences, GB) o Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes, Inc., USA). Los especímenes se analizaron en un microscopio confocal Leica SP2 o se analizaron por FACS.

Resultados:

Cuando las células H322M se cultivaron a alta densidad se vieron que mediante microscopia confocal se hizo aparente que IGF-IR se aglomeraba específicamente en los sitios de contacto célula-célula. Cuando se comparaba al crecimiento de células H322M in vivo, esto es tejido injerto heterólogo, había una impresionante similitud con los cultivos densamente empaquetados in vitro así como lo que se refiere a la organización de los receptores de superficie IGF-I.

También se cuantificó por FACS una regulación a la alza de los receptores IGF-I de superficie en cultivos superconfluentes de células H322M. La expresión en superficie del receptor IGF-I aumentó más de 10 veces cuando las células crecieron bajo condiciones de alta densidad en comparación con baja densidad sin contactos célula-célula significativos.

Otras células tumorales tales como HT29, MDA231 y MCF-7 mostraron un comportamiento similar, indicando que la regulación a la alza de los receptores IGF-I en la superficie celular en el establecimiento de los sitios de contacto célula-célula no es una característica única de las células

109

107

H322M pero parece ser una propiedad general de un tejido más así como la organización que también se encuentra in vivo (Fig. 1).

Ejemplo 4

5 **La inhibición del crecimiento de las células tumorales H322M expresando IGF-IR en cultivos 3D bajo tratamiento con anticuerpo 18 (ensayo WST)**

Las células H322M se cultivaron en RPMI1640/0,5% medio FCS en placas cubiertas con poli-HEMA (poli(2-
10 hidroxietilmetacrilato)) para prevenir la adherencia a la superficie plástica. Bajo esas condiciones, las células H322M formaron esferoides densos que crecieron tridimensionalmente (una propiedad que es llamada independencia de anclaje). Estos esferoides se asemejan estrechamente a la
15 histoarquitectura tridimensional y la organización de tumores sólidos in situ. Los cultivos esferoides se incubaron durante 5 días en la presencia de cantidades crecientes de anticuerpos de 0-240 nM. El ensayo de conversión WST se usó para medir la inhibición del crecimiento. Cuando los culti-
20 vos esferoides H322M se trataron con concentraciones diferentes de anticuerpo 18 (1-240 nM) se pudo observar una inhibición dependiente de la dosis en el crecimiento (Fig. 2).

Ejemplo 5

25 **Inhibición del Crecimiento de las células tumorales H322M expresando IGF-IR en cultivos 3D (ensayo de formación de colonias)**

Las células H322M se cultivaron en RPMI1640/10% medio

no

108

NCS en placas cubiertas con poli-HEMA para prevenir la adherencia a la superficie plástica. Bajo estas condiciones, las células H322M formaban esferoides densos que crecían tridimensionalmente (una propiedad que se llama independencia de anclaje). Estos esferoides representan la histoarquitectura tridimensional y organización de los tumores sólidos in situ. Los cultivos esferoides se incubaron durante 5-10 días en presencia de cantidades crecientes de anticuerpos desde 0-7,5µg/ml. El anticuerpo monoclonal <HBV> se usó como control negativo. Las colonias se observaron en un microscopio invertido (Zeiss Axiovert) usando contraste de fases y se contaron usando un sistema de imagen automatizado (MetaMorf). Cuando los cultivos esferoides H322M se trataron con diferentes concentraciones (0,5-7,5µg/ml) de anticuerpo 18, se pudo observar una inhibición dependiente de la dosis en el crecimiento, mientras que el anticuerpo control <HBV> casi que ni tenía o no tenía efecto. Tanto el número como el tamaño de las colonias se redujo claramente en los cultivos tratados con 7,5 µg/ml de anticuerpo 18 (Fig. 3).

El análisis cuantitativo de colonias mayores de 100µm de diámetro reveló que el número de colonias se redujo alrededor del 66% en los cultivos tratados con 0,5µg/ml de anticuerpo 18 (Fig. 4).

Ejemplo 6

Inhibición de IGF-I y IGF-II unidos a células tumorales expresando IGF-IR

Con el fin de determinar la capacidad del anticuerpo

111

109

de la invención para bloquear la unión de los ligandos IGF-I y IGF-II al receptor IGF-I (IGF-1R), se realizaron los experimentos de competición con péptidos ligando marcados radiactivamente.

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

15 Para recoger células individuales, se añadieron 2 ml de 1x Tripsina/EDTA (Gibco, Cat. No. 25300-054) por matraz T175 y el desprendimiento de células se monitorizó con un microscopio Zeiss Axiovert25. Las células se recogieron y se añadió medio con 10% FCS tal como se describió anteriormente
20 a un volumen total de 50 ml. Las células se volvieron a aislar mediante centrifugación durante 10 minutos a 1000 rpm (Heraeus sepatech, Omnifuge 2.0 RS) y se resuspendieron en 50 ml de tampón de unión (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1 mM EDTA, 10 mM D(+)glucosa, 15 mM NaAc, 100 mM
25 Hepes pH 7,6, 1% BSA). Las células se contaron, se re-aislaron mediante centrifugación y se ajustaron con tampón de unión a 1×10^6 células/ml.

Los péptidos IGF-I y IGF-II marcados con I¹²⁵ (Amers-

112

ham, ~2000 Ci/mmol, Cat. No. IM172 y IM238), solubilizados en 0,1% CH₃COOH, se diluyeron en tampón de unión a una actividad final de 4×10^5 contajes/(minuto x ml). 75 µl de anticuerpo a las concentraciones especificadas junto con 25
5 µl de péptido IGF-I ó IGF-II prediluido marcado con I¹²⁵ se añadieron a 200 µl de suspensión celular y se incubó durante 3,5 h a 4°C. Las células se re-aislaron por centrifugación durante 5 minutos a 2000 rpm (Eppendorf, 5415C) y se eliminó el sobrenadante. Tras lavar dos veces en 1 ml de
10 tampón de unión, las células se resuspendieron en 1 ml de tampón de unión y se transfirió a tubos de centelleo. La cantidad de péptido radioactivo unido a los receptores de la superficie celular se midió en un contador de centelleo.

Las curvas de CI₅₀ resultantes que demuestran la capacidad del anticuerpo para inhibir la unión del péptido IGF-I e IGF-II al receptor IGF-I se muestran en las Figs. 5 y 6. El valor CI₅₀ promedio para el anticuerpo 18 es 0,3 nM. Para este anticuerpo, no se pudo detectar inhibición dependiente de concentración de IGF-II unido al receptor. Los
15 resultados para el anticuerpo αIR3 se muestran en la Fig. 7. No se pudo observar inhibición detectable para la unión IGF-II.

Ejemplo 7

Ensayo competitivo de anticuerpos para la unión IGF-IR

25 Para el mapeo de epítopos de anticuerpos monoclonales anti-IGF-IR se seleccionó un formato similar al de medición de la afinidad (Ejemplo 2), pero IGF-IR se pre-incubó durante al menos 0,5 horas a temperatura ambiente con el an-

ticuerpo en la solución. Esta mezcla se inyectó y se detectó la unión IGF-IR (o inhibición). Este ensayo permitió medir la actividad inhibidora recíproca de los anticuerpos monoclonales para la unión IGF-IR. Se encontró que los anticuerpos de la invención compiten por unirse a IGF-IR con α IR3, un anticuerpo que es conocido por unirse a los aa 217-274 (Gustafson, T.A., y Rutter, W.J., J. Biol. Chem. 265 (1990) 18663-18667).

Ejemplo 8

Inhibición de la fosforilación mediada por IGF-I de IGF-IR y Akt/pkB

Con el fin de determinar la capacidad del anticuerpo de la invención para inhibir la activación y fosforilación del receptor IGF-I (IGF-IR), se realizaron experimentos competitivos con el péptido IGF-I y consiguiente análisis por Western blot con anticuerpos específicos para la tirosina fosforilada.

Las células tumorales humanas (HT29, NCI H322M, 5×10^4 /ml) se pusieron en medio RPMI 1640 medium (PAA, Cat. No. E15-039) suplementado con 2 mM de L-Glutamina, 1x aminoácidos no esenciales (Gibco, Cat. No. 11140-035), 1 mM piruvato sódico (Gibco, Cat. No. 11360-039) y 0,5% de FCS inactivado por calor (PAA, Cat. No. A15-771). Para determinar los valores CI_{50} , las placas de 12 pocillos se inocularon con 1 ml de células en el respectivo medio para cada experimento y se cultivó durante dos días a 37°C y 5% CO_2 .

Tras 48 horas de cultivo con medio de bajo suero, el medio se extrajo cuidadosamente y se reemplazó por diferen-

112

tes concentraciones de anticuerpo diluido en el respectivo medio. Tras 5 minutos de incubación a 37°C y 5% CO₂ el péptido IGF-I se añadió a una concentración final de 2 nM y las células se incubaron de nuevo durante 10 minutos bajo las condiciones mencionadas anteriormente. El medio se extrajo cuidadosamente mediante aspiración y se añadieron 100 µl de tampón de lisis frío por pocillo (50 mM Hepes pH 7,2, 150 mM NaCl, 1mM EGTA, 10% glicerol, 1% Triton®-X100, 100 mM NaF, 10 mM Na₄P₂O₇, inhibidor de la proteasa Complete®).

10 Las células se desprendieron usando un raspador de células (Corning, Cat. No. 3010) y los contenidos del pocillo se transfirieron a tubos de reacción Eppendorf. Los fragmentos celulares se eliminaron por centrifugación durante 10 minutos a 13000 rpm y 4°C y la mitad del sobrenadante se añadió

15 a 2x al tampón de muestra Laemmli en una proporción 1:1 (v/v). Para la inmunoprecipitación de IGF-IR, los restos sobrenadantes de lisados celulares se sometieron a un aclaramiento por centrifugado (10 minutos a 13000 rpm y 4°C) justo antes de añadir 1 µl de anticuerpo policlonal frente IGF-IRβ (C-20, Santa Cruz Biotechnologies) o un anticuerpo monoclonal murino (IgG1) que reconocía un epítipo con los aminoácidos 440-586 del dominio extracelular (cadena α) del receptor humano IGF Tipo 1 (mAb 24-55, GroPep). Tras 2 horas de incubación a 4°C en un rotador de tubos de reacción Eppendorf, 25 µl de cabezas de Proteína G Sefarose®

20 (Amersham Biosciences, Cat. No. 17-0618-01) se añadieron seguidos de otro paso de incubación de 1 hora a 4°C. Las cabezas con complejos proteína-anticuerpo unidos se aisla-

115

113

ron por centrifugación (1 minuto a 2000 rpm y 4°C) y se lavaron tres veces con un tampón de lavado (tampón de lisis con sólo 0,1% Triton®-X100). Tras hervir estas cabezas en el mismo tampón de muestra Laemmli, las proteínas celulares se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN® BA 85, Schleicher&Schuell) mediante Western blot semi-seco.

Un anticuerpo específico fosfotirosina (Upstate, clone 4G10, Cat. No. 05-321) se usó para determinar el estado de fosforilación de IGF-IR inmunopurificado. Para la detección de Akt/pkB fosforilado, se aplicó un anticuerpo con especificidad para Ser473 fosforilado (Cell Signalling, Cat. No. 9271).

El bloqueo observado de IGF-I indujo la fosforilación de ambos IGF-IR y Akt/pkB tal como se muestra en la Fig. 8.

Ejemplo 9

Inducción de una regulación a la baja mediada por anticuerpos de IGF-IR in-vitro

Con el fin de detectar los efectos del anticuerpo de la invención en la cantidad de receptor IGF-I (IGF-IR) en células tumorales, se realizaron experimentos de transcurso del tiempo y posterior análisis por western-blot con anticuerpos específicos IGF-IR.

Las células tumorales humanas (HT29, 5×10^4 células/ml) en medio RPMI 1640 (PAA, Cat. No. E15-039) se suplementaron con 2 mM de L-Glutamina, 1x aminoácidos no esenciales (Gibco, Cat. No. 11140-035), 1 mM de piruvato sódico (Gibco, Cat. No. 11360-039) y 10% FCS inactivada por

116

114

calor (PAA, Cat. No. A15-771). Para cada periodo de incubación se inoculó una placa de 12 pocillos con 1 ml de células en el respectivo medio para cada experimento y se cultivó durante 24 horas a 37°C y 5% CO₂.

5 El medio se extrajo cuidadosamente y se reemplazó por concentraciones diferentes de anticuerpo diluidos en el respectivo medio. En dos pocillos control, el medio se reemplazó por otro medio sin anticuerpo o por un medio con un anticuerpo control (AB-1, Oncogene, Cat. No. GR11). Las células se incubaron a 37°C y 5% CO₂ y las placas individuales se cogieron para otros procedimientos tras 15 minutos, 24 horas y 48 horas.

15 El medio se extrajo cuidadosamente por aspiración y se añadieron 100 µl de tampón de lisis frío por pocillo (50 mM Hepes pH 7,2, 150 mM NaCl, 1mM EGTA, 10% glicerol, 1% Triton®-X100, 100mM NaF, 10 mM Na₄P₂O₇, inhibidor de la proteasa Complete®). Las células se desprendieron usando un raspador de células (Corning, Cat. No. 3010) y los contenidos del pocillo se transfirieron a tubos de reacción Eppendorf.

20 Los fragmentos celulares se eliminaron por centrifugación durante 10 minutos a 13000 rpm y 4°C y el sobrenadante se añadió a 2x tampón de muestra Laemmli en una proporción 1:1 (v/v). Las proteínas celulares se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa

25 (PROTRAN® BA 85, Schleicher&Schuell, Cat. No. 10 401196) mediante western-blot semi-seco.

Un anticuerpo específico para IGF-IR (C-20, Santa Cruz Biotechnologies, Cat. No. sc-713) se usó para determinar

117

115

niveles de proteínas de IGF-IR.

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

5 **Ejemplo 10**

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

10 Con el fin de determinar si el anticuerpo de la invención también bloquea la unión de la insulina al receptor de insulina (IR), los experimentos competitivos se realizaron con un péptido ligando marcado radioactivamente.

15 Las células 3T3 (1×10^5 /ml) expresando recombinantemente altos números de IR humana ($>10^5$) se pusieron en medio MEM Dulbecco (DMEM) con elevada glucosa (PAA, Cat. No. E15-009) suplementada con 2mM de L-Glutamina (Gibco, Cat. No. 25030-024) y 10% de FCS inactivado por calor (PAA, Cat. No. A15-771). Seis matraces del formato T175 se inocularon con 20 ml de células en el respectivo medio para cada experimento y se cultivó durante dos días a 37°C y 5% CO₂ para obtener monocapas celulares confluentes.

20 Para recoger las células individuales, 2 ml de 1x Tripsina/EDTA (Gibco, Cat. No. 25300-054) por matraz T175 se añadieron y el desprendimiento de células se monitorizó con un microscopio. Las células se recogieron y se añadió 25 medio con 10% FCS tal como se describió anteriormente a un volumen total de 50 ml. Las células se volvieron a aislar por centrifugación durante 10 minutos a 1000 rpm y se re-suspendieron en 50 ml de tampón de unión (120 mM NaCl, 5 mM

118

116

KCl, 1,2 mM MgSO₄, 1 mM EDTA, 10 mM D(+)glucosa, 15 mM NaAc, 100 mM Hepes pH 7,6, 1% BSA). Se contaron las células, se volvieron a aislar por centrifugación y se ajustaron con tampón de unión a 1×10^6 células/ml.

5 El péptido insulina marcado con I¹²⁵ (Amersham, Cat. No. IM166, ~2000 Ci/mmol), solubilizado en 0,1% CH₃COOH, se diluyó en tampón de unión a una actividad final de 4×10^5 contajes/(minuto*ml). 75 µl del anticuerpo junto con 25 µl de péptido insulina marcado con I¹²⁵ pre-diluido se añadieron a 200 µl de suspensión celular (concentración de anticuerpo final 200 nM) y se incubó durante 3,5 h a 4°C. Las células se reaislaron por centrifugación durante 5 minutos a 2000 rpm y el sobrenadante se eliminó. Tras lavar dos veces en 1 ml de tampón de unión, las células se resuspendieron en 1 ml de tampón de unión y se transfirieron a tubos de centelleo. La cantidad de péptido radioactivo unido a los receptores de superficie celular se midió en un contador de centelleo.

10

15

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

20

Ejemplo 11

No estimulación de IGF-IR y fosforilación Akt/pkB

Con el fin de excluir las actividades estimulantes de IGF-IR del anticuerpo de la invención, la fosforilación de IGF-IR se determinó en la ausencia de ligando IGF-I pero en presencia del anticuerpo de la invención y un anticuerpo de referencia (αIR3, Oncogene, Alemania). Esto se realizó me-

25

119

117

diante un análisis por western-blot con anticuerpos específicos en estado de fosforilación. Las células 3T3 (ATCC CRL 1658) se transfectaron con IGF-IR (5×10^4 células/ml, Pietrzowski, Z., et al., Cell Growth Differ. 4 (1992) 199-205) se pusieron en medio MEM Dulbecco (DMEM) con elevada glucosa (PAA, CatNo. E15-009) suplementado con 2mM de L-Glutamina (Gibco, CatNo. 25030-024) y 0,5% de FCS inactivado por calor (PAA, CatNo. A15-771) o células tumorales humanas (HT29, NCI H322M, 5×10^4 /ml) en medio RPMI 1640 (PAA, CatNo. E15-039) suplementado con 2 mM de L-Glutamina, 1x aminoácidos no esenciales (Gibco, CatNo. 11140-035), 1 mM de piruvato sódico (Gibco, CatNo. 11360-039) y 0,5% de FCS inactivado por calor (PAA, CatNo. A15-771). Para determinar los valores de CI_{50} , placas de 12 pocillos se inocularon con 1 ml de células en el medio respectivo para cada experimento y se cultivó durante dos días a 37°C y 5% CO_2 .

Tras 48 horas de cultivo con medio de suero bajo, el medio se extrajo cuidadosamente y se reemplazo con diferentes concentraciones de anticuerpo diluido en el medio respectivo. Las células se incubaron durante 15 minutos bajo las condiciones mencionadas anteriormente. El medio se extrajo cuidadosamente por aspiración y se añadieron 100 µl de tampón de lisis frío por pocillo (50 mM Hepes pH 7,2, 150 mM NaCl, 1mM EGTA, 10% glicerol, 1% Triton-X100, 100mM NaF, 10 mM $Na_4P_2O_7$, inhibidor de la proteasa Complete™). Las células se desprendieron usando un raspador de células (Corning, CatNo. 3010) y los contenidos del pocillo se transfirieron a tubos de reacción Eppendorf. Los fragmentos

118

celulares se eliminaron por centrifugación durante 10 minutos a 13000 rpm y 4°C (Eppendorf centrífuga 5415R) y la mitad del sobrenadante se añadió a 2x tampón de muestra Laemmli en una proporción 1:1 (v/v). Para la inmunoprecipitación de IGF-IR, el sobrenadante remanente de los lisados celulares que sufrieron un aclaramiento por centrifugación (10 minutos a 13000 rpm y 4°C) justo antes de añadir 1 µl del anticuerpo contra IGF-IR (C-20, Santa Cruz Biotechnologies, CatNo. sc-713 o mAb 24-55, GroPep, CatNo. MAD1). Tras 2 horas de incubación a 4°C en un rotador de tubos de reacción Eppendorf, se añadieron 25 µl de cabezas de Proteína G Sefarose™ (Amersham Biosciences, CatNo. 17-0618-01) seguido de otro paso de incubación de 1 hora a 4°C. Las cabezas con complejos anticuerpo-proteína unidos se aislaron por centrifugación (1 minuto a 2000 rpm y 4°C) y se lavaron tres veces con tampón de lavado (tampón de lisis con sólo 0,1% Triton-X100). Tras hervir las cabezas con tampón de muestra Laemmli, las proteínas celulares se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN BA 85, Schleicher&Schuell, CatNo. 10 401196) mediante western-blot semi-seco.

Un anticuerpo específico de fosfotirosina (Upstate, clon 4G10, CatNo. 05-321, reconoce proteínas fosforiladas de tirosina) se usó para determinar el estado de fosforilación de IGF-IR inmunopurificado. Para la detección de Akt/pkB fosforilado, un anticuerpo contra Akt1 con especificidad para Ser473 fosforilado (Cell Signalling, CatNo. 9271) se aplicó.

121

Se observó que the la quínasa Akt/pkB corriente abajo en la vía de señalización de IGF-IR se activó significativamente por el anticuerpo de referencia a concentraciones mayores de 5 nM pero no por el anticuerpo de la invención a concentraciones de hasta 10.000 nM. Los resultados se muestran en Figs. 10 y 11 (HM=medio de suero bajo con 0,5% FCS, HM+IGFT= medio de suero bajo con 0,5% FCS y 10 nM hIGF-I).

Ejemplo 12

Inducción de la regulación a la baja en modelos de injertos heterologos H322M

Los tumores se indujeron en ratones nude y se trataron una vez con concentraciones diferentes del anticuerpo de la invención. 24 horas tras el tratamiento los tumores se extrajeron y se homogenizaron bajo nitrógeno líquido. El tampón de lisis frío se añadió (50 mM Hepes pH 7,2, 150 mM NaCl, 1mM EGTA, 10% glicerol, 1% Triton-X100, 100mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, inhibidor de la proteasa Complete™, 1mM PMSF) en un volumen de tampón en una proporción de peso del tumor de 3:1 y se mezcló concienzudamente con el homogenado de tumor descongelado. Tras solubilizar el tejido durante 15 minutos en hielo, los fragmentos insolubles se extrajeron por centrifugación durante 10 minutos a 13000 rpm y 4°C (centrifuga Eppendorf 5415R). La concentración de proteína de las muestras se determinó con los Reactivos Micro BCA™ (Pierce) y el tampón de lisis se añadió para ajustar concentraciones iguales. Parte del sobrenadante se añadió a 2x tampón de muestra Laemmli en una proporción 1:1 (v/v). Las proteínas celulares se separaron por SDS-PAGE y

120

se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN BA 85, Schleicher&Schuell, CatNo. 10 401196) mediante western-blot semi-seco. Un anticuerpo específico IGF-IR (C-20, Santa Cruz Biotechnologies, CatNo. sc-713) se usó para detectar IGF-IR.

Tras el tratamiento con el anticuerpo de la invención, observamos una disminución dependiente de la concentración de los niveles de IGF-IR con una EC50 estimada a 0,6 mg/kg (Figura 12).

Ejemplo 13

ELISA de Unión Clq

Introducción

Para determinar la capacidad de los anticuerpos de acuerdo con la presente invención para fijar Clq se usó un ELISA. Clq es parte del sistema inmune adaptativo y, tras la unión a los complejos inmunes, activando la activación secuencial de varios zimógenos. Las enzimas a su vez, causan la escisión de moléculas C3, que puede resultar en el inicio de reacciones inflamatorias, opsonización de partículas aberrantes o extrañas y lisis de las membranas celulares.

En principio, la placa ELISA se cubre con unos rangos de concentración del anticuerpo, a los que se añade Clq humana. La unión Clq se detectó por un anticuerpo dirigido contra Clq humana seguido de un conjugado marcado con peroxidasa.

Materiales y métodos

Los anticuerpos 18, 8 y 23 y los anticuerpos control

123

121

se ensayaron en concentraciones de 10, 5, 1 y 0,5 $\mu\text{g/ml}$. La Tabla 1 muestra las especificidades de las muestras ensayadas. Como control negativo se usó una IgG4 humana (CLB, stock 0,5 $\mu\text{g/ml}$), que une Clq muy débilmente. La IgG1 humana se incorporó como control positivo. Se usó la solución estoc Clq humana con una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$. Para la detección de Clq se usaron un anticuerpo de conejo dirigido contra Clq (Dako) y un anticuerpo IgG anti-conejo, conjugado con peroxidasa de rábano picante (Sigma).

10 **Cálculos y ajuste de curvas**

Los cálculos que se refieren a unión máxima (Bmax) del HuMAb ensayado se determinaron usando un ajuste de rectas de regresión no lineal (un sitio de unión) usando el software Grafpad Prism.

15 **Resultados**

Los anticuerpos de acuerdo con la invención muestran una unión dependiente de dosis de la proteína Clq humana. La densidad óptica a 405 nm (DO 405 nm) se representó frente las concentraciones de HuMAb y las curvas se ajustaron usando regresión no lineal. Los mejores valores de ajuste para la unión máxima (Bmax) se listan en la Tabla 2, como se muestran el coeficiente de correlación de la recta (R2) y la desviación estándar para cada valor. El coeficiente de correlación más bajo tenía un valor de 0,950 (IgG4). Con una unión máxima de 0,279, la IgG4 humana (control negativo) muestra la unión mínima de Clq. Los controles positivos IgG1 y IgG3 ambos se unían a Clq, tal como se muestra para la unión máxima de 1.729 y 2.223, respectivamente.

124

122

Tabla 2

Unión máxima (Bmax) de la HuMAb ensayado en el ELISA de unión Clq (n=3)

Mejores valores ajustados	Bmax	Desviación estándar Bmax	Calidad del ajuste R ²	Desviación estándar R ²
IgG1	1,729	0,166	0,983	0,010
IgG3	2,223	0,947	0,995	0,005
IgG4	0,279	0,280	0,950	0,041
Anticuerpo 18	1,670	0,601	0,988	0,005

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

Comparado con la unión Clq de la IgG4 humana (control negativo, con una D.O. de 0,279), todos los anticuerpos ensayados eran igualmente capaces de fijar Clq.

Ejemplo 14

10 **Determinación de las funciones efectoras mediadas por anticuerpos por anti-IGF-IR HuMAbs**

Con el fin de determinar la capacidad de los anticuerpos HuMAb generados para evocar mecanismos efectores inmunes, se realizaron estudios de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

20 Para estudiar CDC (National Cancer Institute, línea celular de adenocarcinoma de pulmón), células H322M, H460 y NIH 3T3 (2-6 x 10⁶) se marcaron con 100 µCi ⁵¹Cr durante 45-120 minutos (Amersham Pharmacia Biotech, UK, Cat CJS11). Tras marcar las células se lavaron dos veces con 40 ml de

125

123

PBS y se centrifugaron durante 3 minutos a 1500 rpm. Las células entonces se pusieron en 5.000 por pocillo en una placa con el fondo redondo, en un volumen de 50 µl. Se añadieron los anticuerpos a una concentración final en el rango de 25-0,1 µg/ml en un volumen de 50 µl de medio de cultivo celular a 50 µl de suspensión celular y se incubó durante 30-60 minutos. Tras la incubación el exceso de anticuerpo se eliminó lavando dos veces con PBS. Se añadieron 100 µl de una agrupación activa o inactiva (30 minutos a 56°C) de suero humano, conejillo de indias, conejo o ratones nude diluidos entre 1/3-1/30, y las células se incubaron durante 3 horas, tras lo que las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 minutos. 100 µl del sobrenadante se cultivaron, y se transfirieron a tubos de polipropileno y se contaron en un contador γ.

Para estudiar los efectos de los anticuerpos en ADCC, H322M, H460 y NIH 3T3 u otras células apropiadas que expresan IGF-IR ($2-6 \times 10^6$) éstas se marcaron con 100 µCi ^{51}Cr durante 45-120 minutos (Amersham Pharmacia Biotech, UK, Cat CJS11), se lavó dos veces con 40 ml of PBS y se centrifugo durante 3 minutos a 1500 rpm. Las células se pusieron en 5.000 por pocillo en una placa de culo redondo, en un volumen de 50 µl. Los anticuerpos HuMAb se añadieron a una concentración final desde 25-0,1 µg/ml en un volumen de 50 µl de medio de cultivo celular a 50 µl de suspensión celular y se incubó durante 15 minutos. A continuación, 50 µl de células efectoras, PBMC fresco aislado o células efectoras purificadas a partir de la capa de leucocitos, se añadieron

124

a una proporción E:T en el rango de 100:1 a 5:1. Las placas se centrifugaron durante 2 minutos a 500-700 rpm, y se incubó durante toda la noche a 37°C. Tras la incubación, las células se centrifugaron durante 3 minutos a 1500 rpm y 100 µl de sobrenadante se cultivaron, se transfirieron a tubos de polipropileno y se contaron en un contador γ.

La magnitud de la lisis celular por CDC o ADCC se expresa como % de la liberación máxima de la radioactividad a partir de las células diana lisadas por detergente corregidas por liberación espontánea de la radioactividad a partir de las respectivas células diana.

Ejemplo 15

Inhibición del Crecimiento de tumores H322M

Los efectos del anticuerpo 18 in vivo se investigaron por inducción de tumores en ratones nude sin timo de acuerdo con métodos establecidos. Las células H322M NSCLC humanas se coinyectaron junto con Matrigel subcutáneamente en ratones nu atímicos (nu/nu) de 6-7 semanas de edad. Con este propósito, 5×10^6 células H322M se concentraron en 100 µl de medio de cultivo y se mezclaron con 100 µl de Matrigel. 200 µl de esta mezcla se inyectaron en los costados derechos de los ratones. El volumen del tumor se calculó midiendo los diámetros del tumor con calíperos Vernier dos veces por semana de acuerdo con la fórmula publicada primero 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) donde el volumen del tumor [mg] = $(\text{longitud} \times (\text{ancho})^2)$. El anticuerpo

125

se administró intraperitonealmente (i.p.) a 10 ml/kg. El tratamiento empezó con dosis dobles del anticuerpo administrado en volúmenes dobles. Se inducieron los tumores en ratones nude tal como se describe anteriormente. Después que los tumores hayan crecido en un volumen promedio de 160 mg, los ratones se trataron intraperitonealmente seis veces una vez por semana con 6, 0,6 y 0,06 mg/kg de anticuerpo como dosis consecutivas partiendo con 12, 1.2 y 0,12 mg/kg como dosis de carga dada una vez el primer día de tratamiento. La figura 13 describe los volúmenes de tumor medidos durante el tratamiento hasta el día 67, cuando los animales se sacrificaron y el experimento terminó. El experimento demuestra que el bloqueo del eje IGF-IR mediante los resultados rhu anti-IGF-IR mAb 18 en eficacia anti-tumoral cuando se administra como un agente simple a 6 y 0,6 mg/kg. En contraposición, 0,06 mg/kg no tenían efecto en el crecimiento tumoral.

Además el anticuerpo 18 se ensayó en combinación con gemcitabina en el mismo modelo. Los tumores se indujeron tal como se describen anteriormente y el tratamiento se inició cuando los tumores se habían establecidos y crecieron a un promedio de 170mm³ en todos los grupos. El anticuerpo se administró una vez a la semana i.p. a 6 y 0,6 mg/kg y en combinación con 62 mg/kg de gemcitabina a 0,6 mg. La gemcitabina se administra en un ciclo es decir cada tres días durante cuatro veces en total. De nuevo, el tratamiento se empezó administrando dosis dobles de anticuerpo. La Figura 14 muestra el tamaño del tumor en relación

128

126

con varios tratamientos a través del tiempo. El experimento demuestra que el anticuerpo 18 administrado una vez cada siete días inhibe el crecimiento tumoral por si mismo y potencia la efectividad de la gemcitabina, un compuesto anti-metabólico conocido.

Ejemplo 16

Inhibición del Crecimiento de los tumores 3T3

Los tumores se indujeron en ratones nude esencialmente tal como se describe en el Ejemplo 15 excepto que se usaron los fibroblastos 3T3 de ratón que sobreexpresan el IGF-IR humano. Los ratones con los tumores establecidos de aproximadamente 180 mg se trataron intraperitonealmente una vez por semana durante siete veces con 18, 6 ó 0,6 mg/kg de anticuerpo 18. Otra vez, el tratamiento se empezó con dosis dobles de anticuerpo dado como dosis de carga (36, 12 y 1,2 mg/kg). El experimento demuestra que mediante el tratamiento con el anticuerpo, el crecimiento tumoral se puede retrasar cuando se administra a 18 y 6 mg/kg una vez por semana (Figura 15).

Listado de Referencias

Adams, T.E., et al., Cell. Mol. Life Sci. 57 (2000) 1050-1063

Aplin, J.D.. y Wriston, J.C. Jr., CRC Crit. Rev. Biochem. (1981) 259-306

Arteaga, C.L., et al., Breast Cancer Res. Treatment 22 (1992) 101-106

Ausubel, F., et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing y Wiley Interscience, New

112

127

York (1987)

Barnes, L.M., et al., Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261-270

Barnes, L.M., et al., Cytotechnology 32 (2000) 109-123

5 Benini, S., et al., Clin. Cancer Res. 7 (2001) 1790-1797

Berge, S.M., et al., J. Pharm. Sci. 66 (1977) 1-19

Bergmann, U., et al., Cancer Res. 55 (1995) 2007-2011

10 Brüggemann, M., et al., J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361

C Brunetti, A., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 165 (1989) 212-218

Carter, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289

15 Chen, J., et al., EMBO J. 12 (1993) 821-830

Chen, J., et al., International Immunology 5 (1993) 647-656

Delafontaine, P., et al., J. Mol. Cell. Cardiol. 26 (1994) 1659-1673

20 Dricu, A., et al., Glycobiology 9 (1999) 571-579

Durocher, Y., et al., Nucl. Acids. Res. 30 (2002) E9

Edge, A.S., et al. Anal. Biochem. 118 (1981) 131-137

Fishwild, D.M., et al., Nat. Biotechnol. 14 (1996) 845-851

25 Forsayeth, J.R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 3448-3451

Geisse, S., et al., Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282

130

128

Gustafson, T.A., y Rutter, W.J., J. Biol. Chem. 265
(1990) 18663-18667

Hailey, J., et al., Mol. Cancer Ther. 1 (2002) 1349-
1353

5 Harding, F., y Lonberg, N., Ann. N. Acad. Sci 764
(1995) 536-546

Hoyne, P.A., et al., FEBS Lett. 469 (2000) 57-60

Johnson, G., y Wu, T.T., Nucleic Acids Res. 28 (2000)
214-218

10 Jones, P., et al., Nature 321 (1986) 522-525

Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological
Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institu-
tes of Health, Bethesda, MD. (1991)

Kalebic, T., et al., Cancer Res. 54 (1994) 5531-5534

15 Kanter-Lewensohn, L., et al., Melanoma Res. 8 (1998)
389-397

Kato, H., et al., J. Biol. Chem. 268 (1993) 2655-2661

Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-161

Kull, F.C. Jr., et al. J. Biol. Chem. 258 (1983) 6561-
20 6566

LeRoith, D., et al., Endocrin. Rev. 16 (1995) 143-163

Li, S.L., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 196
(1993) 92-98

Li, S.L., et al., Cancer Immunol. Immunother. 49
25 (2000) 243-252

Lonberg, N., y Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. 25
(1995) 65-93

Lonberg, N., et al., Nature 368 (1994) 856-859

131

129

- Lonberg, N., Handbook of Experimental Pharmacology 113
(1994) 49-101
- Love, T.W., et al., Methods Enzymol. 178 (1989) 515-
527
- 5 Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202
- Morgan, D.O., y Roth, R.A., Biochemistry 25 (1986)
1364-1371
- Morrison, S.L., et al., Proc. Natl. Acad Sci. USA 81
(1984) 6851-6855
- 10 Neuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270
- Norderhaug, L., et al., J. Immunol. Methods 204 (1997)
77-87
- O'Brien, R.M., et al., EMBO J. 6 (1987) 4003-4010
- Orlandi, R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86
15 (1989) 3833-3837
- Pessino, A., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun.
162 (1989) 1236-1243
- Pietrzkowski, Z., et al., Cell Growth Differ. 4 (1992)
199-205
- 20 Prigent, S.A., et al., J. Biol. Chem. 265 (1990) 9970-
9977
- Queen, C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86
(1989) 10029-10033
- Riechmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327
- 25 Rohlik, Q.T., et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 149
(1987) 276-281
- Schaefer, E.M., et al., J. Biol. Chem. 265 (1990)
13248-13253

132

Schlaeger, E.-J., y Christensen, K., Cytotechnology 30
(1999) 71-83

Schlaeger, E.-J., J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-
199

5 Scotlandi, K., et al., Cancer Gene Ther. 9 (2002) 296-
307

Scotlandi, K., et al., Int. J. Cancer 101 (2002) 11-16

Sojahn, H.T., y Bahl, O.P., Arch. Biochem. Biophys.
259 (1987) 52-57

10 Soos, M.A., et al., Biochem. J. 235 (1986) 199-208

Soos, M.A., et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 12955-
12963

Soos, M.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86
(1989) 5217-5221

15 Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Tar-
geted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et
al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985)

Surinya, K.H., et al., J. Biol. Chem. 277 (2002)
16718-16725

20 Taylor, L., et al., Int. Immunol. 6 (1994) 579-
591 Choi, T.K., et al., Nature Genetics 4 (1993) 117-123

Taylor, L., et al., Nucleic Acids Research 20 (1992)
6287-6295

Taylor, R., et al., Biochem. J. 242 (1987) 123-129

25 Thotakura, N.R., y Bahl, O.P., Meth. Enzymol. 138
(1987) 350-359

Tuailon, N., et al., Immunol. 152 (1994) 2912-2920

Tuailon, N., et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 90

131

(1993) 3720-3724

Tulloch, P.A., et al., J. Struct. Biol. 125 (1999) 11-18

Patente estadounidense N° 4.179.337

5 Patente estadounidense N° 4.301.144

Patente estadounidense N° 4.487.603

Patente estadounidense N° 4.496.689

Patente estadounidense N° 4.640.835

Patente estadounidense N° 4.670.417

- 10 Patente estadounidense N° 4.675.187

Patente estadounidense N° 4.791.192

Patente estadounidense N° 5.202.238

Patente estadounidense N° 5.204.244

Patente estadounidense N° 5.545.806

15 Patente estadounidense N° 5.545.807

Patente estadounidense N° 5.569.825

Patente estadounidense N° 5.625.126

Patente estadounidense N° 5.633.425

Patente estadounidense N° 5.661.016

20 Patente estadounidense N° 5.770.429

Patente estadounidense N° 5.789.650

Patente estadounidense N° 5.814.318

Patente estadounidense N° 5.874.299

Patente estadounidense N° 5.877.397

25 van Dijk, M.A., y van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Pharmacol. 5 (2001) 368-374

Vitetta, E.S., et al., Science 238 (1987) 1098-1104

Werner, R.G., Drug Res. 48 (1998) 870-880

134

132

Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical
Society Transactions, 14, pp.. 375-382, 615th Meeting Bel-
fast (1986)

WO 01/14424

5 WO 02/053596

WO 87/05330

WO 92/03918

WO 92/22645

WO 93/1227

10 WO 94/11026

WO 94/25585

WO 98/24884

135

133

Reivindicaciones

1. El anticuerpo unido a IGF-IR o inhibiendo la unión de IGF-I y IGF-II a IGF-IR, caracterizado en que dicho anticuerpo

- 5 a) es del isotipo IgG1,
- b) muestra una tasa de valores de CI_{50} de inhibición de la unión de IGF-I a IGF-IR a la inhibición de la unión de IGF-II a IGF-IR de 1:3 a 3:1,
- 10 c) inhibe para al menos un 80% a una concentración de 5 nM, la fosforilación IGF-IR en un ensayo de fosforilación celular usando células HT29 en un medio conteniendo 0,5% de suero de ternera fetal inactivado (FCS) cuando se compara con tal ensayo sin dicho anticuerpo, y
- 15 d) no muestra actividad estimuladora de IGF-IR medida como fosforilación IGF-IR a una concentración de 10 μ M en un ensayo de fosforilación celular usando células 3T3 proporcionando de 400.000 a 600.000 moléculas IGF-IR por célula en un medio que contiene 0,5% de suero de ternera fetal inactivado por calor (FCS)
- 20 cuando se compara con tal ensayo sin dicho anticuerpo.

2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado en que dicho anticuerpo induce la muerte celular del 20% o más células de una preparación de células que expresan IGF-IR tras 24 horas a una concentración de dicho anticuerpo de 100 nM por ADCC.

3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 ó

136

134

2, caracterizado en que dicho anticuerpo induce la muerte del 20% o más células de una preparación de células que expresan IGF-1R tras 4 h a una concentración de anticuerpos de dicho anticuerpo de 100 nM por CDC.

5 4. El anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por ser un anticuerpo humano o humanizado.

10 5. El anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por una afinidad de alrededor de 10^{-13} a 10^{-9} M (K_D).

6. El anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por comprender como regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) con las siguientes secuencias:

15 a) una cadena pesada de anticuerpo comprendiendo como CDRs CDR1 (aa 31-35), CDR2 (aa 50-66) y CDR3 (aa 99-107)

de ID de SEC N°:1 ó 3;

 b) una cadena ligera de anticuerpo comprendiendo como CDRs CDR1 (aa 24-34), CDR2 (aa 50-56) y CDR3 (aa 89-98)

de ID de SEC N°:2 ó 4.

7. Anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6 que se puede obtener a partir de la línea celular hibridoma <IGF-1R> HUMAB Clon 18 (DSM ACC 2587) o <IGF-1R> HUMAB Clon 22 (DSM ACC 2594).

25 8. El uso de un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7 para la elaboración de una composición farmacéutica.

9. Una composición farmacéutica que contiene un anti-

137

135

cuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7 en una cantidad farmacéuticamente efectiva.

10. Las líneas celulares de híbridoma <IGF-1R> HUMAB Clon 18 (DSM ACC 2587) y <IGF-1R> HUMAB Clon 22 (DSM ACC 2594).

11. Método para la elaboración de una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7.

12. Un ácido nucleico codificando un polipéptido capaz de ensamblarse junto con la otra cadena de anticuerpo respectivamente definida posteriormente, mientras que dicho polipéptido es cualquiera de

a) una cadena pesada de anticuerpo comprendiendo como CDRs CDR1 (aa 31-35), CDR2 (aa 50-66) y CDR3 (aa 99-107)

de ID de SEC N°:1 ó 3;

b) una cadena ligera de anticuerpo comprendiendo como CDRs CDR1 (aa 24-34), CDR2 (aa 50-56) y CDR3 (aa 89-98)

de ID de SEC N°:2 ó 4;

13. Un vector de expresión comprendiendo un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 12, capaz de expresar dicho ácido nucleico en una célula huésped procariota o eucariota.

14. Una célula huésped procariota o eucariota comprendiendo el vector de acuerdo con la reivindicación 13.

15. Un método para la producción de un polipéptido que una a IGF-IR e inhiba la unión de IGF-I y IGF-II a IGF-IR, caracterizado por la expresión de un ácido nucleico codifi-

138

cando una cadena pesada y un ácido nucleico codificando una cadena ligera de acuerdo con la reivindicación 11 en una célula huésped procariota o eucariota y recuperando dicho polipéptido de dicha célula.

5 16. Método para el tratamiento de un paciente en necesidad de una terapia antitumoral, caracterizada por la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7.

10 17. Método de acuerdo con la reivindicación 16, caracterizada en que el anticuerpo se administra en combinación con un agente citotóxico, un pro-fármaco de los mismos o radioterapia citotóxica.

15 18. Método para la selección de un anticuerpo contra IGF-IR a partir de una pluralidad de anticuerpos contra IGF-IR caracterizados en que un ensayo de fosforilación celular usando células 3T3 proporcionó de 400.000 a 600.000 moléculas de IGF-IR por célula en un medio que contiene suero de ternera fetal inactivado por calor 0,5% (FCS) se
20 realiza con dichos anticuerpos y dicho anticuerpo seleccionado no muestra actividad estimulante IGF-IR medida como la fosforilación PKB a una concentración de 10 μ M cuando se compara con tal ensayo sin dicho anticuerpo.

25 19. Método para la preparación de una composición farmacéutica caracterizada en seleccionar un anticuerpo contra IGF-IR a partir de una pluralidad de anticuerpos contra IGF-IR realizando un ensayo de fosforilación celular usando células 3T3 proporcionando de 400.000 a 600.000 moléculas

137

IGF-IR por célula en un medio que contiene suero de ternera fetal inactivado por calor 0,5% (FCS) con dichos anticuerpos y seleccionando dicho anticuerpo que no muestra actividad estimulante IGF-IR medida como la fosforilación pKB a una concentración de 10 μ M cuando se compara con tal ensayo sin dicho anticuerpo, produciendo dicho anticuerpo por métodos de expresión recombinante, recuperando dicho anticuerpo y combinando dicho anticuerpo con un tampón y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

5

10

1140

138

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche

<120> Anticuerpos contra el receptor I del factor de crecimiento de tipo insulínico y los usos de los mismos

<130> 21695

<150> EP 03015526

<151> 2003-07-10

<160> 8

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

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

141

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

Leu Val Ser Val Ser Ser
115

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

<400> 2

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 4
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

141

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

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

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

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

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

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

<400> 5
gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag 48
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac 96
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc 144
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc 192
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc 240
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

144

142

tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys 85 90 95	288
aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys 100 105 110	336
cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro 115 120 125	384
aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys 130 135 140	432
gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp 145 150 155 160	480
tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat qcc aag aca aag ccg cgg gag Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu 165 170 175	528
gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu 180 185 190	576
cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn 195 200 205	624
aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly 210 215 220	672
cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu 225 230 235 240	720
ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr 245 250 255	768
ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn 260 265 270	816

145

aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc 864
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac 912
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg 960
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa , 990
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 6
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

144

-7-

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

147

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

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

<210> 7
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

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

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

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

tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa 144
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

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

acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag 240
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

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

ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt 321
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

146

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

<400> 8

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

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

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

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

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

149

Fig.1

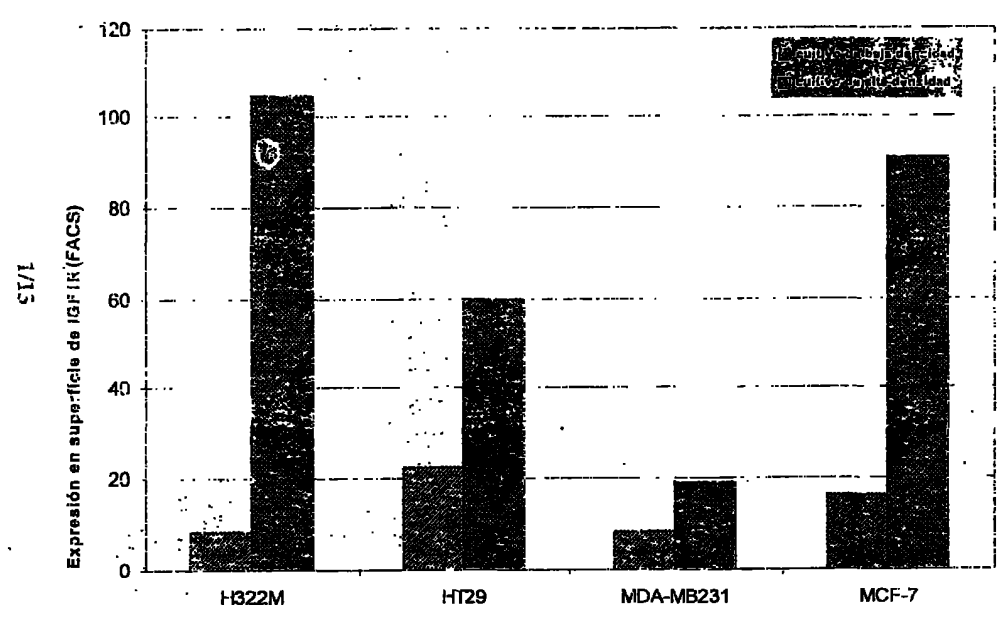


Fig.2

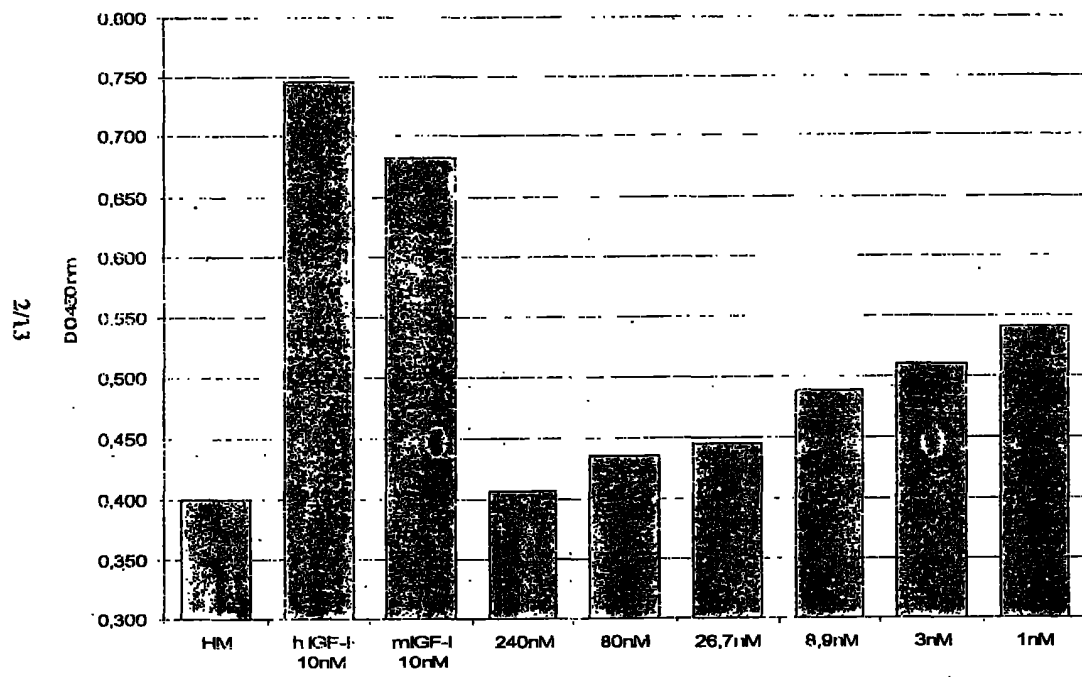


Fig.3

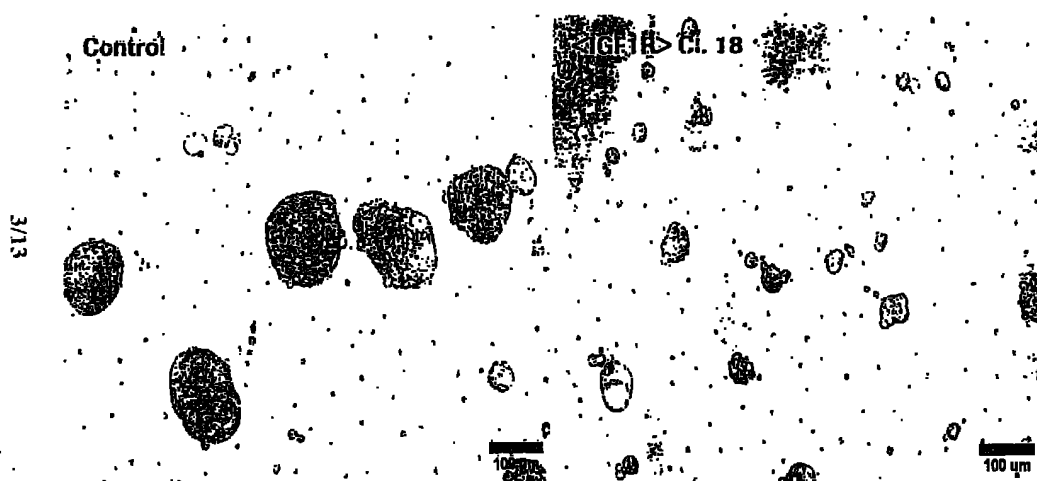


Fig.4

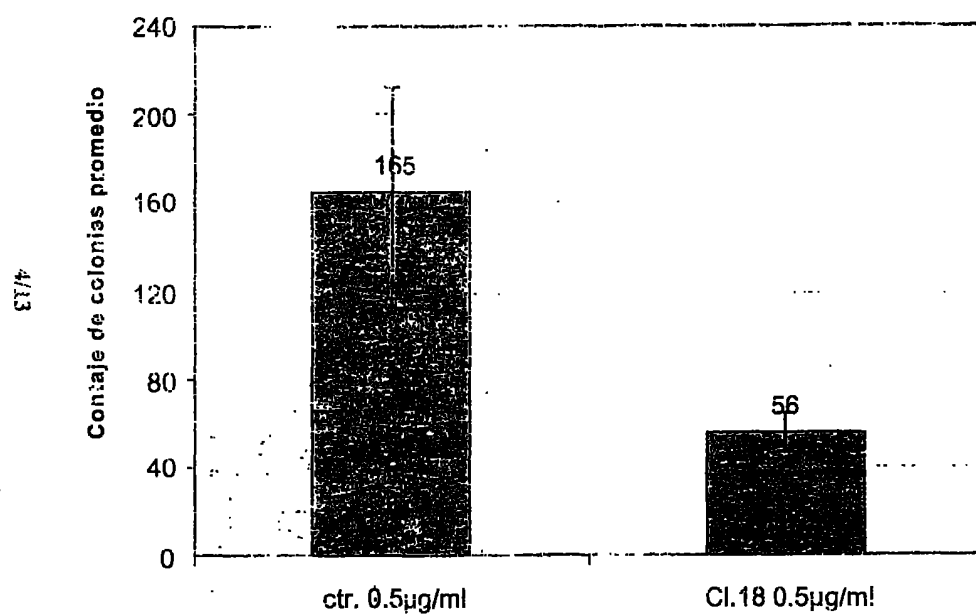


Fig.5

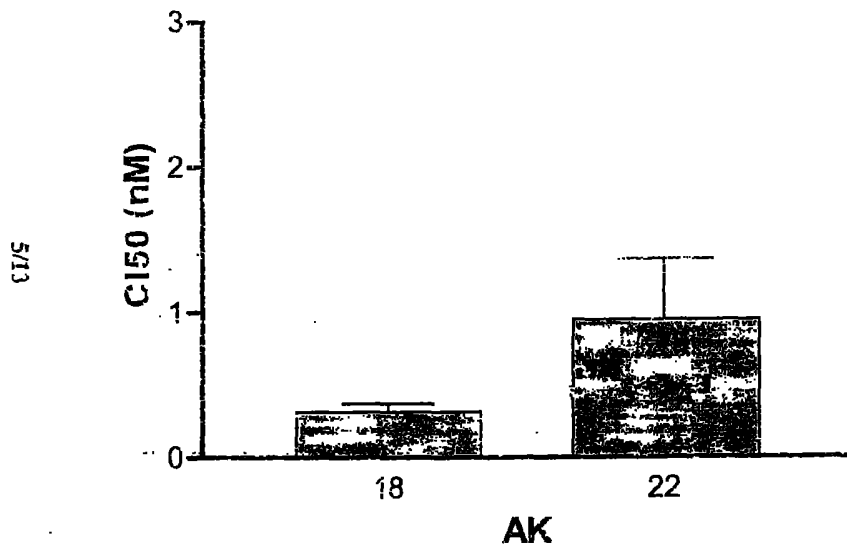


Fig.6

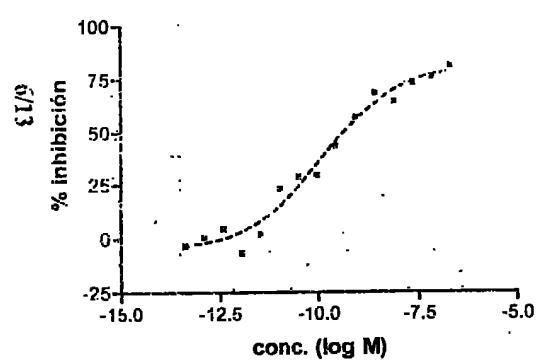


Fig.7

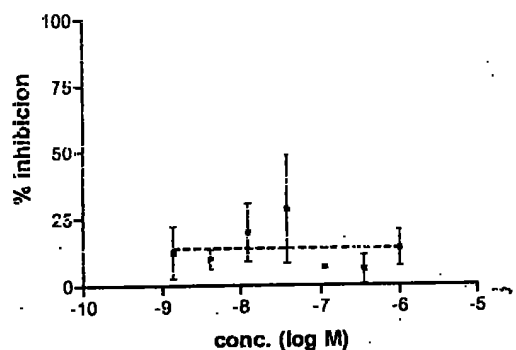
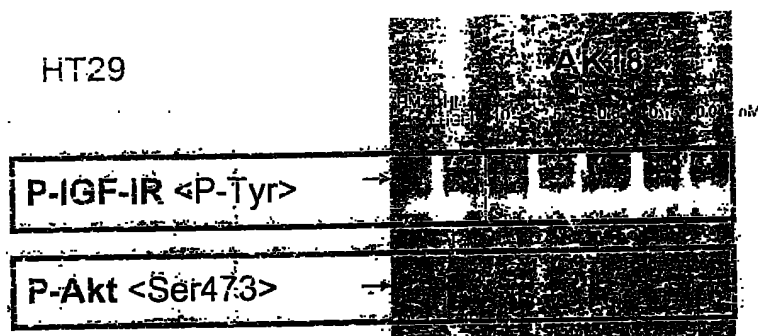


Fig.8



7/13

Fig.9

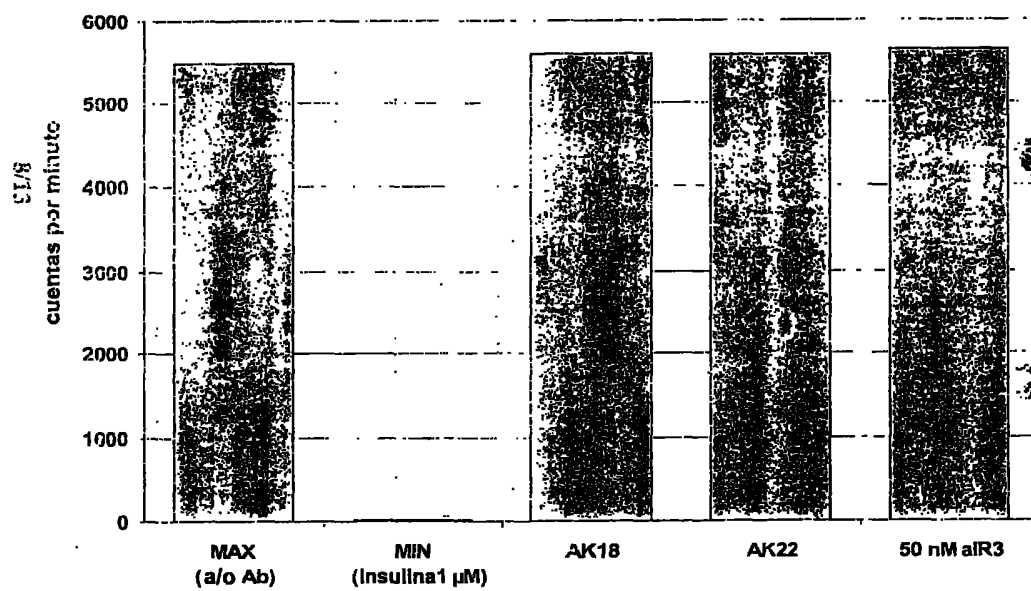


Fig.10

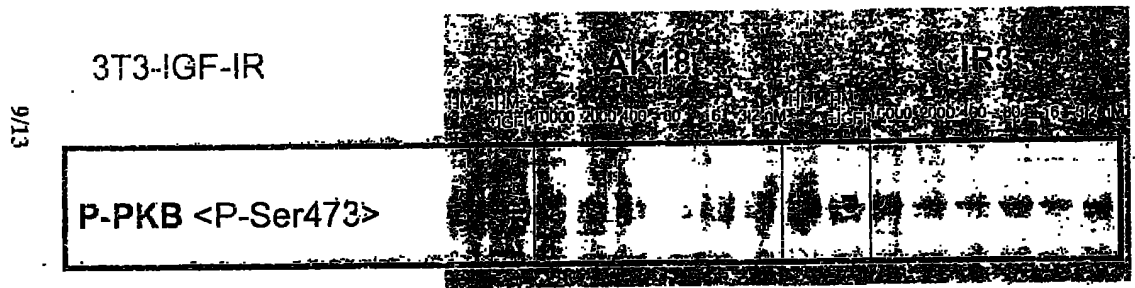


Fig.11

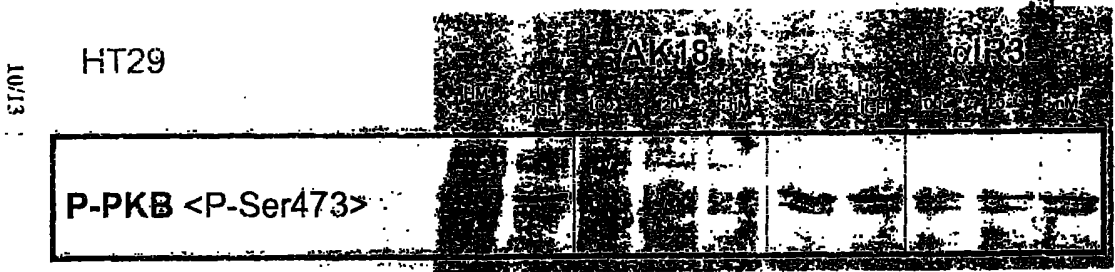


Fig.12

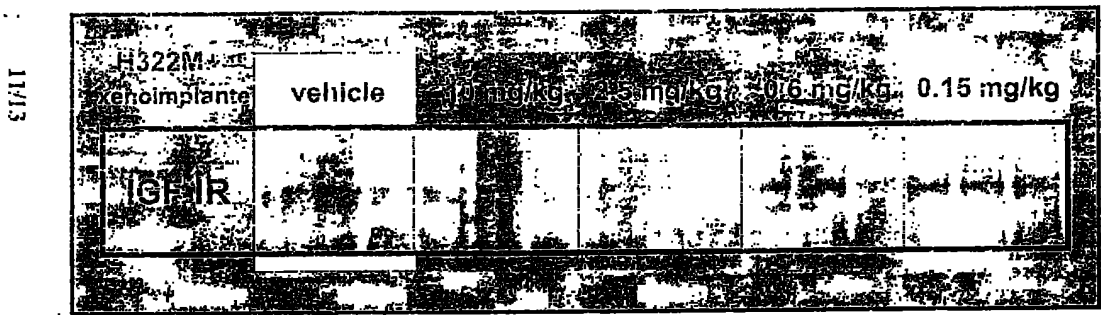


Fig. 13

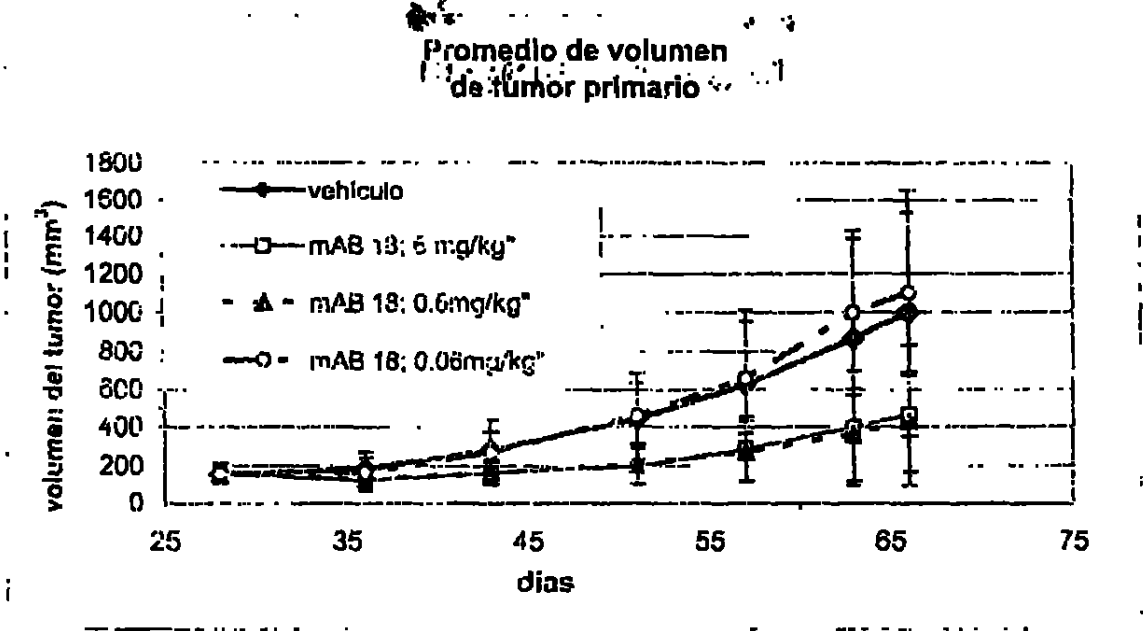


Fig. 14

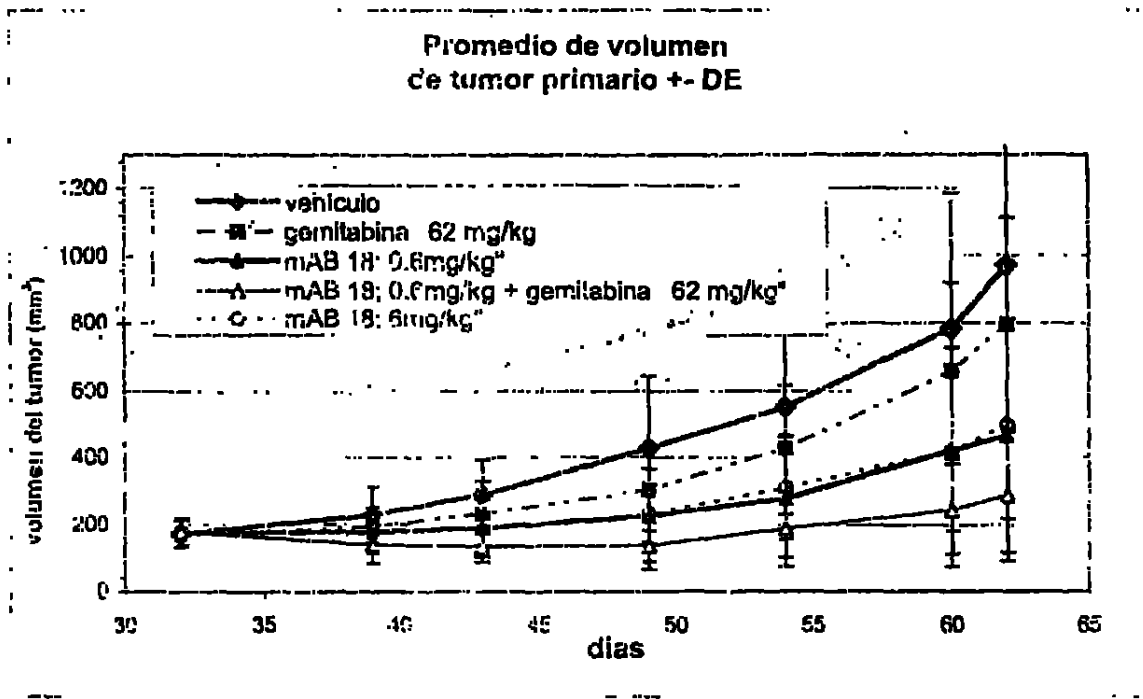
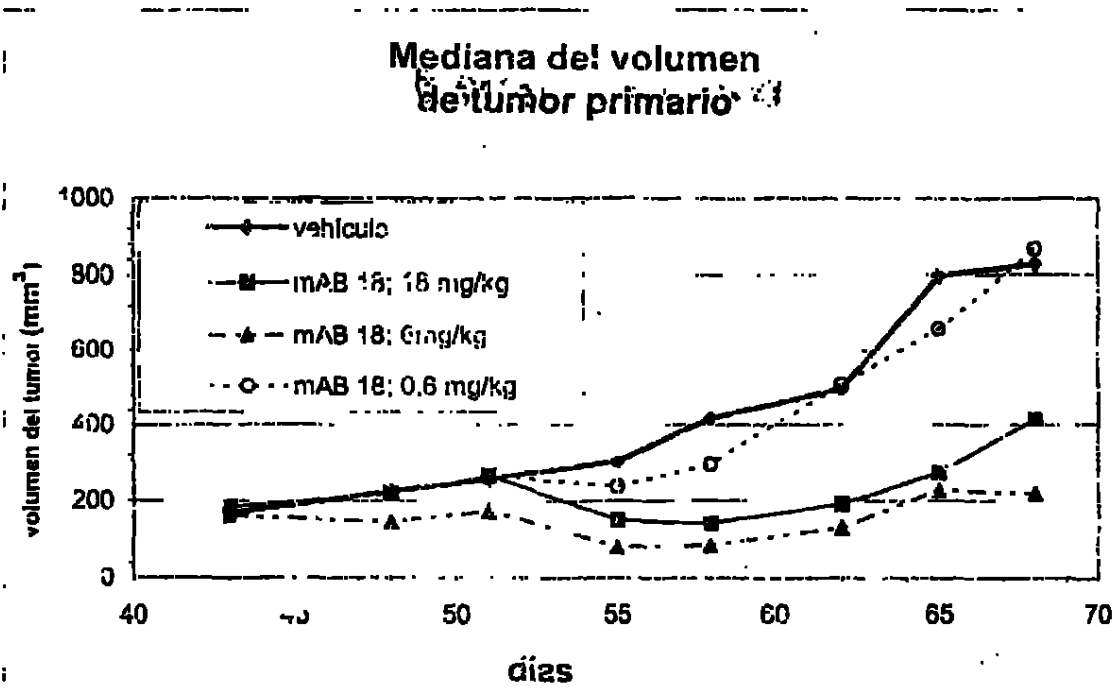


Fig. 15



160

TRADUCCION OFICIAL No. 11118

de un documento escrito en Alemán, efectuada por Luz Ariaga de Herber, resolución del Ministerio de Justicia 599 del 6 de marzo 1978.-

Traducción de las certificaciones y apostilla en alemán que se encuentran a continuación de una declaración expedida en idioma inglés bajo el No. 2004/333 por el notario Peter Kuster, el 22.07.2004, en Basilea, Suiza, sobre la autenticidad de la copia de un documento de Cesión, caso 21695, escrito en inglés, presentado a él por la F. Hoffmann-La Roche AG.

A continuación de la lista de los nueve inventores de la invención: Anticuerpos contra el receptor I del factor de crecimiento de tipo Insulínico y usos de los mismos.

Legalización de las firmas de los señores Ivo Graus, Paul Parren, Frank Rebers, Jan van de Winkel, Martine Vriesema van Vugt, por el notario de Utrech, señor Terhorst, el 6 de julio de 2004.

Siguen 4 firmas ilegibles de los señores Erhard Kopetzki, Klaus-Peter Kuenkele, Olaf Mundigl y Ralf Schumache.

Protocolo notarial No. K 800 / 2004

del 28. 5 2004 / H

Certifico la autenticidad de las firmas antecedentes puestas ante mí por los señores

Erhard Kopetzki, nacido el 25 de octubre 1954, Bioquímico, domiciliado en Kastnerhofstr. 21, 82377 Penzberg,

LUZ ARIAGA DE HERBER
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL

Resolución No.599 Minjusticia

163

a quien yo, el notario, conozco en persona,

Dr. Klaus-Peter Künkele, nacido el 7 de abril 1985, Biólogo, domiciliado en Karwendelstraße 9, 83671 Benediktbeuern, identificado con carnet oficial provisto de fotografía,

Dr. Olaf Alfons Mundigl, nacido el 8 de diciembre 1963, Biólogo, domiciliado en Tassiloring 16, 82362 Weilheim, identificado con carnet oficial provisto de fotografía.

Penzberg, 28 de mayo 2004
(sello redondo en tinta)

Fdo.. firma ilegible
Nikolaus Klöcker
Notario de Weilheim i OB

Protocolo notarial No. K 991 / 2004

del 8 de julio 2004 / li

Certifico la autenticidad de la firma antecedente puesta ante mí por el señor

Dr. Ralf Schumacher, nacido el 12 de febrero de 1963, Biólogo, domiciliado en Hochfeldstraße 78, 82377 Penzberg, identificado con carnet oficial provisto de fotografía.

Penzberg, 8 de julio 2004
(sello redondo en tinta)

Fdo.<. firma ilegible
Nikolaus Klöcker
Notario de Weilheim i OB

Luz Arriaga de Herber
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
Luz Arriaga de Herber
Resolución No.599 Minjusticia

162

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Suiza

Este documento público

2. Ha sido firmado por el Lic. iur. Peter Kuster

3. Actuando en calidad de notario público

4. Lleva el sello del mencionado notario

Certificado

5. en Basel (Basilea)

6. el 26 de julio de 2004

7. por la Cancillería de Estado del Cantón de Basel-Stadt

8. bajo el No. 7890/12103

9. Sello

10. Firma

Cancillería de Estado

Fdo.: firma ilegible

de Basel-Stadt (Ciudad de Basilea)

Ruedi Eggs

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los archivos de estas oficinas para su confrontación.

Bogotá, 04 de enero de 2006

C. 2320


LUZ ARRIAGA DE HERBER
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
Resolución No.599 Minjusticia

165

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

506332
Luz Arnaga
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2006 JAN 11 A 10:41
Cura
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

DECLARACION

Yo, el suscrito Notario Público de Basilea, Suiza, por medio del presente declaro que las copias adjuntas intituladas: "Traspaso" son dos copias válidas del documento original que me ha sido presentado por

F. Hoffmann – La Roche AG
de Basilea / Suiza,

este 22-07-2004 (veintidós de Julio del año dos mil cuatro)

Firma (ilegible)

Dr. Peter Kuster, Abogado y Notario

Nº 333

N. del T. Este documento porta un sello-emblema en relieve sobre por un cintillo blanco-negro, con la leyenda: "PETER KUSTER JUD NOTARIUS BASILIENSIS"



ILBA A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretación Oficial
Idioma Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0540
Agosto de 1996

TRASPAS

Caso 21695

164

Yo/Nosotros, los suscritos

Yvo Graus, científico, ciudadano Holandés

Werdorperwaard 3, NL-3984 PR Odijk, Países Bajos.

Erhard Kopetzki, bioquímico, ciudadano Alemán

Kastnerhofstrasse 21, D-82377 Penzberg, Alemania.

Klaus-Peter Kuenkele, biólogo, ciudadano Alemán

Karwendelstrasse 9, D-83671 Benediktbeuern, Alemania.

Olaf Mundigl, biólogo, ciudadano Alemán

Tassiloring 16, D-82362 Weilheim, Alemania.

Paul Parren, científico, ciudadano Holandés

Werdorperwaard 17, NL-3984 PR Odijk, Países Bajos.

Frank Rebers, científico, ciudadano Holandés

Adriaan Menninckkwartier 34, NL-3554 CT Utrecht, Países Bajos.

Ralf Schumacher, biólogo, ciudadano Alemán

Hochfeldstrasse 78, D-82377 Penzberg, Alemania.

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

167

165
Jan van de Winkel, científico, ciudadano Holandés
Verlengde Slotlaan 80, NL-3707 CK Zeist, Países Bajos.

Martine van Vugt, científico, ciudadano Holandés
Fluweelmos 6, NL-3994 KR Houten, Países Bajos.

CEDENTES, por el presente declaramos que somos los inventores colectivos
de la invención intitulada:

**ANTICUERPOS CONTRA EL RECEPTOR I DEL FACTOR DE
CRECIMIENTO DE TIPO INSULINICO Y USOS DE LOS MISMOS.**

Para la cual fue registrada la primera solicitud de la manera siguiente:

<u>País</u>	<u>Fecha de registro</u>	<u>Serie N°</u>
Europa	10.07.2003	03015526.1

Y que por una contraprestación válida y efectiva, cuya recepción y suficiencia
son reconocidas por el presente, NOSOTROS hemos vendido, cedido y
traspasado, todos los derechos y títulos a y de dicha invención y de dicha
solicitud (es) en todos los países del mundo al CESIONARIO:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basilea, Suiza,


ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0730
Agosto de 1990

La asignación presente es para, pero no se limita a los siguientes países:

166

Argentina, Australia, Austria, Bélgica, Brasil, Canadá, Chile, Colombia, República Checa, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Hungría, Irlanda, Israel, Italia, Japón, Kazakstán, Corea, Luxemburgo, México, Mónaco, Los Países Bajos, Nueva Zelanda, Noruega, Pakistán, República de la Gente de China, Filipinas, Polonia, Portugal, Rusia, Arabia Saudita, África del Sur, España, Suecia, Suiza, Taiwán, Turquía, Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte, Ucrania, Uruguay, U.S.A., Venezuela.

En virtud de este traspaso el mencionado CESIONARIO está plenamente facultado para solicitar y para obtener en su nombre o en cualquier otro nombre y para sus propios fines y consideraciones la PATENTE a nivel mundial, especialmente en los países anteriormente mencionados; y para reivindicar por ello el derecho de prioridad de la primera solicitud registrada en los países antes mencionados, de conformidad con los convenios internacionales.

Firmado en Utrecht (Países Bajos) el día cinco (5) de Julio de 2004

Firmas (Ilegibles)

Yvo Graus

Paul Parren

Frank Rebers

Jan van de Winkel

Martine van Vugt



ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia Nu. 0920
Agosto de 1996

169

LEGALIZACION

Visto por mi, Sr. Bart Herman Theodor Terhorst, Notario de Derecho Civil en Utrecht, Países bajos, para la legalización de las firmas sobre el documento adjunto, de:

1. Sra. Martine Jannigje van Vugt, nacida en Werkendam, Países Bajos, el 3 de Marzo de 1970, pasaporte N° 10760556;
2. Sr. Frank E. M. Rebers, nacido en Sliedrecht, Países Bajos, el 15 de Octubre de 1968, licencia de conducir N° 3206168425;
3. Sr. Johannes Gerardus Joseph van de Winkel, nacido en Venray, Países Bajos el 1° de Marzo de 1961, pasaporte N° ND2487742;
4. Sr. Ivo M. F. Graus, nacido en Velsen, Países Bajos, el 1° de Marzo de 1963, licencia de conducir N° 3114127438; y
5. Sr. Paul Willem Henri Ida Parren, nacido en Roermond, Países Bajos, el 30 de Abril de 1963, pasaporte N° NB5216850.

Firmado en Utrecht, Países Bajos

El día seis (6) de Julio de 2004.

Firma (ilegible)

N. del T.: hay un sello: "Mr. B.H. Th. TERHORST – NOTARIS te UTRECHT"


ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL.
 Traductor e Interpretación Oficial
 Inglés Español
 Resolución Minjusticia Nu. 0920
 Agosto de 1996

170

TRASPASO

Caso 21695

Yo/Nosotros, los suscritos

Yvo Graus, científico, ciudadano Holandés

Werdorperwaard 3, NL-3984 PR Odijk, Países Bajos.

Erhard Kopetzki, bioquímico, ciudadano Alemán

Kastnerhofstrasse 21, D-82377 Penzberg, Alemania.

Klaus-Peter Kuenkele, biólogo, ciudadano Alemán

Karwendelstrasse 9, D-83671 Benediktbeuern, Alemania.

Olaf Mundigl, biólogo, ciudadano Alemán

Tassiloring 16, D-82362 Weilheim, Alemania.

Paul Parren, científico, ciudadano Holandés

Werdorperwaard 17, NL-3984 PR Odijk, Países Bajos.

Frank Rebers, científico, ciudadano Holandés

Adriaan Menninckkwartier 34, NL-3554 CT Utrecht, Países Bajos.

Ralf Schumacher, biólogo, ciudadano Alemán

Hochfeldstrasse 78, D-82377 Penzberg, Alemania.


ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

171

Jan van de Winkel, científico, ciudadano Holandés
Verlengde Slotlaan 80, NL-3707 CK Zeist, Países Bajos.

169

Martine van Vugt, científico, ciudadano Holandés
Fluweelmos 6, NL-3994 KR Houten, Países Bajos.

CEDENTES, por el presente declaramos que somos los inventores colectivos
de la invención intitulada:

**ANTICUERPOS CONTRA EL RECEPTOR I DEL FACTOR DE
CRECIMIENTO DE TIPO INSULINICO Y USOS DE LOS MISMOS.**

Para la cual fue registrada la primera solicitud de la manera siguiente:

<u>País</u>	<u>Fecha de registro</u>	<u>Serie N°</u>
Europa	10.07.2003	03015526.1

Y que por una contraprestación válida y efectiva, cuya recepción y suficiencia
son reconocidas por el presente, NOSOTROS hemos vendido, cedido y
traspasado, todos los derechos y títulos a y de dicha invención y de dicha
solicitud (es) en todos los países del mundo al CESIONARIO:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
Grenzacherstrasse 124, CH-4070 Basilea, Suiza,


ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpretre Oficial
Inglés Español In,
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

172

La asignación presente es para, pero no se limita a los siguientes países:

170

Argentina, Australia, Austria, Bélgica, Brasil, Canadá, Chile, Colombia, República Checa, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Hungría, Irlanda, Israel, Italia, Japón, Kazakstán, Corea, Luxemburgo, México, Mónaco, Los Países Bajos, Nueva Zelanda, Noruega, Pakistán, República de la Gente de China, Filipinas, Polonia, Portugal, Rusia, Arabia Saudita, Africa del Sur, España, Suecia, Suiza, Taiwán, Turquía, Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte, Ucrania, Uruguay, U.S.A., Venezuela.

En virtud de este traspaso el mencionado CESIONARIO está plenamente facultado para solicitar y para obtener en su nombre o en cualquier otro nombre y para sus propios fines y consideraciones la PATENTE a nivel mundial, especialmente en los países anteriormente mencionados; y para reivindicar por ello el derecho de prioridad de la primera solicitud registrada en los países antes mencionados, de conformidad con los convenios internacionales.

Firmado en Utrecht (Países Bajos) el día cinco (5) de Julio de 2004

Firmas (ilegibles)

Firmado en: 28-05-2004

08-07-2004

Erhard Kopetzki

Klaus-Peter Kuenkele

Olaf Mundigl

Ralf Schumacher


ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

172

Declaration

I, the undersigned Notary public of Basle/Switzerland, herewith declare that the annexed copies entitled 'Assignment' are true copies of ^{two} the original documents which have been presented to me by

F. Hoffmann-La Roche AG

of Basle/Switzerland.

Basle/Switzerland is 22-07-2004 (twentysecond day of July two thousand and four)
 one word cancelled, one word added Dr. Peter Kuster

Dr. Peter Kuster
 Advokat und Notar
 Peterskirchplatz 12
 Postfach
 CH-4001 Basel

Letzt. -- Loc. No. 333

OFFICIAL AUTHENTICATION

(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz / Suisse)

This official document

2. is signed by Dr. Peter Kuster

3. in his/her function as Adv. Notar

4. and certified by the seal of the Switzerland

Certified

26. Juli 2004

6. on

in Basel (Bâle)

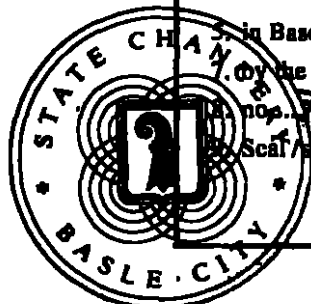
7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt

no. 200/ALAN

Seal / stamp:

10. Signature: Ruedi Egge

Ruedi Egge



Assignment

172

I/WE, the undersigned

Yvo Graus, scientist, a Dutch citizen

~~Pioniersstraat 112, NL-6717 WG Ede, The Netherlands~~ Werdorperwaard 3, NL-3984 PR Odijk, The Netherlands

Erhard Kopetzki, biochemist, a German citizen

Kastnerhofstrasse 21, D-82377 Penzberg, Germany

Klaus-Peter Kuenkele, biologist, a German citizen

Karwendelstrasse 9, D-83671 Benediktbeuern, Germany

Olaf Mundigl, biologist, a German citizen

Tassiloring 16, D-82362 Weilheim, Germany

Paul Parren, scientist, a Dutch citizen

Werdorperwaard 17, NL-3984 PR Odijk, The Netherlands

Frank Rebers, scientist, a Dutch citizen

Adriaan Menninckkwartier 34, NL-3554 CT Utrecht, The Netherlands

Ralf Schumacher, biologist, a German citizen

Hochfeldstrasse 78, D-82377 Penzberg, Germany

Jan van de Winkel, scientist, a Dutch citizen

Verlengde Slotlaan 80, NL-3707 CK Zeist, The Netherlands

Martine Vriessma-van Vugt, scientist, a Dutch citizen

Fluweelmos 6, NL-3994 KR Houten, The Netherlands

ASSIGNOR(S), herewith declare that I am/we are the sole/joint inventor(s) of the invention entitled:

Antibodies against insulin-like growth factor I receptor and uses thereof

for which the first application(s) was (were) filed as follows:

<u>Country</u>	<u>Filing date</u>	<u>Serial No.</u>
Europe	10.07.2003	03015526.1

and that for good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged, I/WE have sold, assigned and transferred all rights and title to and from the said invention and from the said application(s) in all countries of the world to the ASSIGNEE:

F. Hoffmann-La Roche AG
Grenzacherstrasse 124
CH-4070 Basel (Switzerland)

The present assignment is for, but is not limited to the following countries:

Argentina, Australia, Austria, Belgium, Brazil, Canada, Chile, Colombia, Czech Republic, Denmark, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Ireland, Israel, Italy, Japan, Kazakhstan, Korea, Luxembourg, Mexico, Monaco, Netherlands, New Zealand, Norway, Pakistan, People's Republic of China, Philippines, Poland, Portugal, Russia, Saudi Arabia, South Africa, Spain, Sweden, Switzerland, Taiwan, Turkey, United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland, Ukraine, Uruguay, U.S.A., Venezuela.

By virtue of this assignment the said ASSIGNEE is fully entitled to apply for and obtain in their own name or in any other name and for their own purposes and account LETTERS PATENT in the whole world, especially in the above-named countries, and to claim therefor the right of priority of the first filed application(s) in the above-named country (countries) in accordance with international conventions.

Notarization required

175

Signed at

on

173

NOTARIE

Erhard Kopetzki

Klaus-Peter Kuenkele

Olaf Mundigl

Ralf Schumacher

Signed at Utrecht (The Netherlands)

on the 5th day of July, 2004

Yvo Graus

Paul Parren

Frank Rebers

Jan van de Winkel

Martine Vriesema-van Vugt

176



179

Seen by me, Mr. Bart Herman Theodor Terhorst, Civil Law Notary in Utrecht, The Netherlands, for the legalization of the signatures on the attached document, of:

1. Ms. Martine Jannigje van Vugt, born in Werkendam, The Netherlands, on March 3, 1970, passport number M10760556;
2. Mr. Frank E. M. Rebers, born in Sliedrecht, The Netherlands, on October 15th, 1968, driving license number 3206168425;
3. Mr. Johannes Gerardus Joseph van de Winkel, born in Venray, The Netherlands, on March 1, 1961, passport number ND2487742;
4. Mr. Ivo M. F. Graus, born in Velsen, The Netherlands, on March, 1, 1963, driving license number 3114127438; and
5. Mr. Paul Willem Henri Ida Parren, born in Roermond, The Netherlands, on April 30, 1963, passport number NB5216950.

Signed in Utrecht, The Netherlands
On July 6, 2004



177

Assignment

175

I/WE, the undersigned

Yvo Graus, scientist, a Dutch citizen

~~Pienemanstraat 112, NL-6717 WG Bde, The Netherlands~~ Werdorperwaard 3, NL-3984 PR Odiijk, The Netherlands

Erhard Kopetzki, biochemist, a German citizen

Kastnerhofstrasse 21, D-82377 Penzberg, Germany

Klaus-Peter Kuenkele, biologist, a German citizen

Karwendelstrasse 9, D-83671 Benediktbeuern, Germany

Olaf Mundigl, biologist, a German citizen

Tassiloring 16, D-82362 Weilheim, Germany

Paul Parren, scientist, a Dutch citizen

Werdorperwaard 17, NL-3984 PR Odiijk, The Netherlands

Frank Rebers, scientist, a Dutch citizen

Adriaan Menninckkwartier 34, NL-3554 CT Utrecht, The Netherlands

Ralf Schumacher, biologist, a German citizen

Hochfeldstrasse 78, D-82377 Penzberg, Germany

Jan van de Winkel, scientist, a Dutch citizen

Verlengde Slotlaan 80, NL-3707 CK Zeist, The Netherlands

Martine-Vreesema-van Vugt, scientist, a Dutch citizen

Fluweelmos 6, NL-3994 KR Houten, The Netherlands

ASSIGNOR(S), herewith declare that I am/we are the sole/joint inventor(s) of the invention entitled:

Antibodies against insulin-like growth factor I receptor and uses thereof

for which the first application(s) was (were) filed as follows:

<u>Country</u>	<u>Filing date</u>	<u>Serial No.</u>
Europe	10.07.2003	03015526.1

and that for good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged, I/WE have sold, assigned and transferred all rights and title to and from the said invention and from the said application(s) in all countries of the world to the ASSIGNEE:

F. Hoffmann-La Roche AG
Grenzacherstrasse 124
CH-4070 Basel (Switzerland)

The present assignment is for, but is not limited to the following countries:

Argentina, Australia, Austria, Belgium, Brazil, Canada, Chile, Colombia, Czech Republic, Denmark, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Ireland, Israel, Italy, Japan, Kazakhstan, Korea, Luxembourg, Mexico, Monaco, Netherlands, New Zealand, Norway, Pakistan, People's Republic of China, Philippines, Poland, Portugal, Russia, Saudi Arabia, South Africa, Spain, Sweden, Switzerland, Taiwan, Turkey, United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland, Ukraine, Uruguay, U.S.A., Venezuela.

By virtue of this assignment the said ASSIGNEE is fully entitled to apply for and obtain in their own name or in any other name and for their own purposes and account LETTERS PATENT in the whole world, especially in the above-named countries, and to claim therefor the right of priority of the first filed application(s) in the above-named country (countries) in accordance with international conventions.

Notarization required

178

Signed at 28.5.2004
on 8.7.2004

176

<u>Erhard Kopetzki</u>	Erhard Kopetzki
<u>Klaus-Peter Kuenkele</u>	Klaus-Peter Kuenkele
<u>Olaf Mundigl</u>	Olaf Mundigl
<u>Ralf Schumacher</u>	Ralf Schumacher

Signed at
on

_____	Yvo Graus
_____	Paul Parren
_____	Frank Rebers
_____	Jan van de Winkel
_____	Martine Vrieseema-van Vugt

179

URNr. K 800 / 2004

vom 28. 5 2004 / li

Ich beglaubige die vorstehenden, vor mir vollzogenen Unterschriften von

Herrn Erhard Kopetzki, geboren am 25. Oktober 1954, Biochemiker,
Kastnerhofstr. 21, 82377 Penzberg,
mir, Notar, von Person bekannt,

Herrn Dr. Klaus-Peter Künkele, geboren am 7. April 1965, Biologe,
Karwendelstraße 9, 83671 Benediktbeuern,
ausgewiesen durch amtlichen Lichtbildausweis, und

Herrn Dr. Olaf Alfons Mundigl, geboren am 8. Dezember 1963, Biologe,
Tassiloring 16, 82362 Weilheim,
ausgewiesen durch amtlichen Lichtbildausweis.

Penzberg, 28. Mai 2004



A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized 'N' followed by a long horizontal stroke.

Nikolaus Klöcker,
Notar in Weilheim i. OB.

178

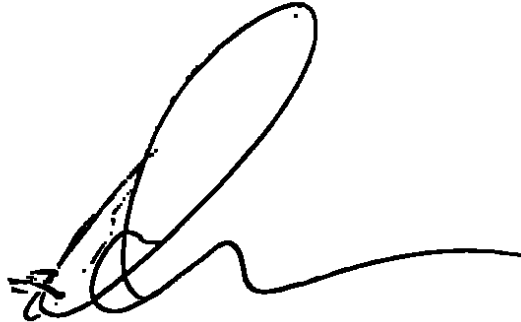
URNr. K 991 / 2004

vom 8. Juli 2004 / li

Ich beglaube die vorstehende, vor mir vollzogene Unterschrift von

Herrn Dr. Ralf Schumacher, geboren am 12. Februar 1963, Biologe,
Hochfeldstraße 78, 82377 Penzberg, ausgewiesen durch amtlichen
Lichtbildausweis.

Penzberg, 8. Juli 2004

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized loop followed by a horizontal line.

Klöcker,

Notar in Weilheim i. OB.

181

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION [x]

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [x] 1
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [x] 1
- ◆ Descripción de la invención [x] 57
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [x] 150
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [x] 2

COMPLETA [x] Y

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

180

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 9

2020
Bogotá D.C.,

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA
Apoderado(a) y/o Representante de
F HOFFMANN LA ROCHE AG

REFERENCIA	Radicación No.	06 2778
	Solicitud internacional	EP/2004/007562
	Fecha inicio fase nacional	10/02/2006
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	416
	Oficio No.	96
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

28 FEB 2006

ALIX CARMENEA CEBEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

adpal