1

PETITORIO

AS: 107.504

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 08-070792- -00000-0000
Fecha: 2008-07-09 16:53:38 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 287

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

13 Julio 2007

1 SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)	Nombre: **ASTRAZENECA AB** Dirección: S-1-51 85 Södertalje, Suecia Nacionalidad o Domicilio: Suecia Lugar de Constitución: Suecia Teléfono: Fax: E-mail:	**IDENTIFICACIÓN** C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual_____ Número _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO Dirección: Cra. 7 No. 71-21 Torre B – Piso 4, Bogotá, Colombia. Teléfono: 744-2200 Fax: 742-2200 E-mail:	**IDENTIFICACIÓN** C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número 80.410.337 TP 57492
4 INVENTOR (ES) (72)	**Nombre:** Olivia RAEBER, Gadi GAZIT-BORNSTEIN, Xiaodong YANG, Susan Ann CARTLIDGE, David William TONGE. **Dirección**: 990 Glennan Dr., Redwood City, California 94061, US; 10 Museum Way, #1526, Cambdrige, Massachusetts 02141, US; 250 El Dorado Avenue, Palo Alto, California 94306, US; Mereside, Alderly Park, Macclesfield Cheshire SK10 4TG, GB; Mereside, Alderly Park, Macclesfield Cheshire SK10 4TG, GB (Respectivamente). **Nacionalidad o Domicilio:** Estados Unidos de América y Gran Bretaña (Respectivamente).	

5 PCT (86)
Solicitud Internacional No. PCT/US2006/047059 Fecha 08-12-2006
Publicación Internacional No WO 2007/070432 A3 Fecha 21-06-2007

6 Título (54): PROTEÍNAS DE UNIÓN ESPECÍFICAS DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO INSULINOIDES Y USOS DE LAS MISMAS

7 Clasificación Internacional (51): _____

8 Prioridad
SI ☒ **NO** ☐

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	13.12.2005	60/750,085
US	14.12.2005	60/750,772
US	17.02.2006	60/774,747
US	24.05.2006	60/808,183

9 Comprobante de pago No. 08 – 39,185 **Fecha** 08-07-2008

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10 **ANEXOS**

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. $ 501.000
- [x] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [x] Poderes, si fuere el caso. **Fotocopia autenticada**
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- [ ] Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- [ ] 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.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] 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, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [x] Otros: Tarjeta de Propietarios
  Documentos PCT

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:

12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

FIRMA: _____

C.C. 80.410.337 de Usaquén TP 57492 del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

107304

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 08-070792- -00000-0000

Fecha: 2008-07-09 16:53:38 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 287

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 39,185
FECHA : MAYO 16 DE 2008

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & URRUTIA LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	768622	16/05/2008	31,980,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	REFERENCIA	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	30005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL : $	501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

107504

A

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
21 June 2007 (21.06.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/070432 A3

(51) International Patent Classification:
A61K 39/395 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2006/047059

(22) International Filing Date:
8 December 2006 (08.12.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/750,085	13 December 2005 (13.12.2005)	US
60/750,772	14 December 2005 (14.12.2005)	US
60/774,747	17 February 2006 (17.02.2006)	US
60/808,183	24 May 2006 (24.05.2006)	US

(71) Applicants *(for all designated States except US)*: **AMGEN FREMONT INC.** [US/US]; 6701 Kaiser Drive, Fremont, California 94555 (US). **ASTRAZENECA AB** [—/SE]; Sodertalje, SE-151 85 (SE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **RAEBER, Olivia** [FR/US]; 990 Glennan Dr., Redwood City, California 94061 (US). **GAZIT-BORNSTEIN, Gadi** [US/US]; 10 Museum Way, #1526, Cambdrige, Massachusetts 02141 (US). **YANG, Xiaodong** [US/US]; 250 El Dorado Avenue, Palo Alto, California 94306 (US). **CARTLIDGE, Susan, Ann** [GB/GB]; Mereside, Alderly Park, Macclesfield Cheshire SK10 4TG (GB). **TONGE, David, William** [GB/GB]; Mereside, Alderly Park, Macclesfield Cheshire SK10 4TG (GB).

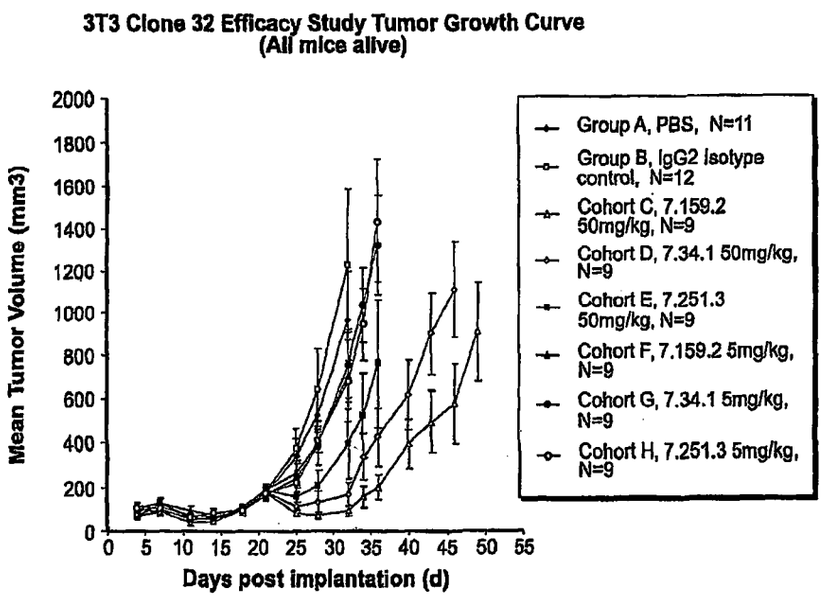
(74) Agent: **FULLER, Michael, L.**; Knobbe Martens Olson & Bear LLP, 2040 Main Street, Fourteenth Floor, Irvine, California 92614 (US).

(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, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

[Continued on next page]

(54) Title: BINDING PROTEINS SPECIFIC FOR INSULIN-LIKE GROWTH FACTORS AND USES THEREOF



(57) Abstract: Binding proteins, such as antibodies directed to IGF-II with cross-reactivity to IGF-I and uses of such antibodies are described. In particular, fully human monoclonal antibodies directed to the IGF-II with cross-reactivity to IGF-I are disclosed. Also discussed are nucleotide sequences encoding, and amino acid sequences comprising, heavy and light chain immunoglobulin molecules, particularly sequences corresponding to contiguous heavy and light chain sequences spanning the framework regions and/or complementarity determining regions (CDR's), specifically from FR1 through FR4 or CDR1 through CDR3.

WO 2007/070432 A3

FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, 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).

Declaration under Rule 4.17:

— *of inventorship (Rule 4.17(iv))*

Published:

— *with international search report*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*

— *with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau*

(88) Date of publication of the international search report:
29 November 2007

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US2006/047059

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/395 C07K16/22 C12N15/09

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)
A61K C07K

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, Sequence Search, EMBASE, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/018671 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK [JP]; JAPAN GOVERNMENT [JP]; OCHIAI ATSUSHI [JP];) 3 March 2005 (2005-03-03) the whole document	1-15, 17-19, 22-55,57
P,X	& EP 1 661 582 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK [JP]; JAPAN GOVERNMENT [JP]) 31 May 2006 (2006-05-31) (Engl. language equivalent of WO2005/018671) Whole document, in particular p.6	1-15, 17-19, 22-55,57
X	EP 1 505 075 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO KK [JP]) 9 February 2005 (2005-02-09) the whole document	1-15, 17-19, 22-55,57

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family 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	Date of mailing of the international search report
12 September 2007	08/10/2007

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
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	Roscoe, Richard

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/047059

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2005/016970 A (IMCLONE SYSTEMS INC [US]; LUDWIG DALE L [US]) 24 February 2005 (2005-02-24) the whole document	1-15, 17-19, 22-55,57
Y	GOYA MASATO ET AL: "Growth inhibition of human prostate cancer cells in human adult bone implanted into nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice by a ligand-specific antibody to human insulin-like growth factors" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 64, no. 17, 2004, pages 6252-6258, XP002982679 ISSN: 0008-5472 the whole document	1-15, 17-19, 22-55,57
A	RUSSEL W E ET AL: "Inhibition of the mitogenic effects of plasma by a monoclonalantibody to somatomedin C" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 81, no. 8, 1984, pages 2389-2392, XP002984258 ISSN: 0027-8424 the whole document	
L	VAN WUK JUDSON J ET AL: "Molecular basis for species and ligand specificity of a monoclonal antibody raised against human IGF-I" ENDOCRINOLOGY, vol. 138, no. 10, 1997, pages 4521-4522, XP002438459 ISSN: 0013-7227 L: Shows lack of clarity regarding binding efficiencies with undefined test parameters the whole document	
A	MIYAMOTO SHIN'ICHI ET AL: "Blockade of paracrine supply of insulin-like growth factors using neutralizing antibodies suppresses the liver metastasis of human colorectal cancers" CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 11, no. 9, 1 May 2005 (2005-05-01), pages 3494-3502, XP002414392 ISSN: 1078-0432 the whole document	

-/--

9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/047059

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ENJOH T ET AL: "Characterization of new monoclonal antibodies to human insulin-like growth factor-II and their application in Western immunoblot analysis" JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, ENDOCRINE SOCIETY, CHEVY CHASE, MD, US, vol. 77, no. 2, 1993, pages 510-517, XP002971827 ISSN: 0021-972X the whole document	
A	MANES S ET AL: "FUNCTIONAL EPITOPE MAPPING OF INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR I (IGF-I) BY ANTI-IGF-I MONOCLONAL ANTIBODIES" ENDOCRINOLOGY, BALTIMORE, MD, US, vol. 138, no. 3, 1997, pages 905-915, XP002918936 ISSN: 0013-7227 the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/047059

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. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

2. [X] 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. [X] 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.:

1-14(all part), 15, 17-19, 22-23, 24-54(all part), 55, 57

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

[X] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT International Application No. PCT/US2006 /047059

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 29-30 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Although claims 41-50 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 1-11(part), 24-27(part), 29-31(part), 33(part), 35-37(part), 40-42(part), 44(part), 46(part), 47(part), 50(part)

Claims 1-11, 24-27, 29-31, 33, 35-37, 40-42, 44, 46, 47, 50 are all only examined insofar as they relate to antibodies. The claimed subject-matter ("binding protein") is on a par with a technically undefined modulator, insofar as it lacks any structural features, and thus cannot be searched and examined insofar as it extends beyond the antibody aspect.

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 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: 1-14(all part), 24-33(all part), 35-38(all part), 40-44(all part), 46-48(all part), 50-54(all part)

   Subject-matter relating to antibody 7.158.1, as exemplified by Seq. ID Nos. 1-4, 39-42. Hybrid antibodies having heavy chains from this mAb. Further constructs and cells expressing any of the above, pharmaceutical and diagnostic uses relating to disorders such as cancer, osteoporosis, diabetes and cardiovascular diseases.

   ---

2. claims: 1-14(all part), 17-19, 24-54(all part), 55

   Subject-matter relating to antibody 7.159.2, as exemplified by Seq. ID Nos.5-8, 43-46, 21-26. Hybrid antibodies having heavy chains from this mAb. Further constructs and cells expressing any of the above, pharmaceutical and diagnostic uses relating to disorders such as cancer, osteoporosis, diabetes and cardiovascular diseases.

   ---

3. claims: 1-14(all part), 16, 20-21, 24-54(all part), 56

   Subject-matter relating to antibody 7.34.1, as exemplified by Seq. ID Nos. 9-12, 47-50, 27-32. Hybrid antibodies having heavy chains from this mAb. Further constructs and cells expressing any of the above, pharmaceutical and diagnostic uses relating to disorders such as cancer, osteoporosis, diabetes and cardiovascular diseases.

   ---

4. claims: 1-14(all part), 15, 22-23, 24-54(all part), 57

   Subject-matter relating to antibody 7.251.3, as exemplified by Seq. ID Nos. 13-16, 51-54, 33-38. Hybrid antibodies having heavy chains from this mAb. Further constructs and cells expressing any of the above, pharmaceutical and diagnostic uses relating to disorders such as cancer, osteoporosis, diabetes and cardiovascular diseases.

   ---

5. claims: 1-14(all part), 24-33(all part), 35-38(all part), 40-44(all part), 46-48(all part), 50-54(all part)

   Subject-matter relating to antibody 7.234.1, as exemplified by Seq. ID Nos. 17-20, 55-58 Hybrid antibodies having heavy chains from this mAb. Further constructs and cells expressing any of the above, pharmaceutical and diagnostic uses relating to disorders such as cancer, osteoporosis, diabetes and cardiovascular diseases.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2006/047059

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005018671 A	03-03-2005	CA 2536288 A1	03-03-2005
		EP 1661582 A1	31-05-2006
		US 2006263362 A1	23-11-2006
EP 1661582 A	31-05-2006	CA 2536288 A1	03-03-2005
		WO 2005018671 A1	03-03-2005
		US 2006263362 A1	23-11-2006
EP 1505075 A1	09-02-2005	AU 2003231554 A1	17-11-2003
		CA 2483848 A1	13-11-2003
		WO 03093317 A1	13-11-2003
		US 2006165695 A1	27-07-2006
WO 2005016970 A	24-02-2005	CA 2524305 A1	24-02-2005
		EP 1622942 A2	08-02-2006
		MX PA06001458 A	15-05-2006

107504
13

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
21 June 2007 (21.06.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/070432 A2

(51) International Patent Classification: Not classified

(21) International Application Number:
PCT/US2006/047059

(22) International Filing Date:
8 December 2006 (08.12.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/750,085	13 December 2005 (13.12.2005)	US
60/750,772	14 December 2005 (14.12.2005)	US
60/774,747	17 February 2006 (17.02.2006)	US
60/808,183	24 May 2006 (24.05.2006)	US

(71) Applicants *(for all designated States except US)*: **AMGEN FREMONT INC.** [US/US]; 6701 Kaiser Drive, Fremont, California 94555 (US). **ASTRAZENECA AB** [—/SE]; Sodertalje, SE-151 85 (SE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **RAEBER, Olivia** [FR/US]; 990 Glennan Dr., Redwood City, California 94061 (US). **GAZIT-BORNSTEIN, Gadi** [US/US]; 10 Museum Way, #1526, Cambdrige, Massachusetts 02141 (US). **YANG, Xiaodong** [US/US]; 250 El Dorado Avenue, Palo Alto, California 94306 (US). **CARTLIDGE, Susan, Ann** [GB/GB]; Mereside, Alderly Park, Macclesfield Cheshire SK10 4TG (GB). **TONGE, David, William** [GB/GB]; Mereside, Alderly Park, Macclesfield Cheshire SK10 4TG (GB).

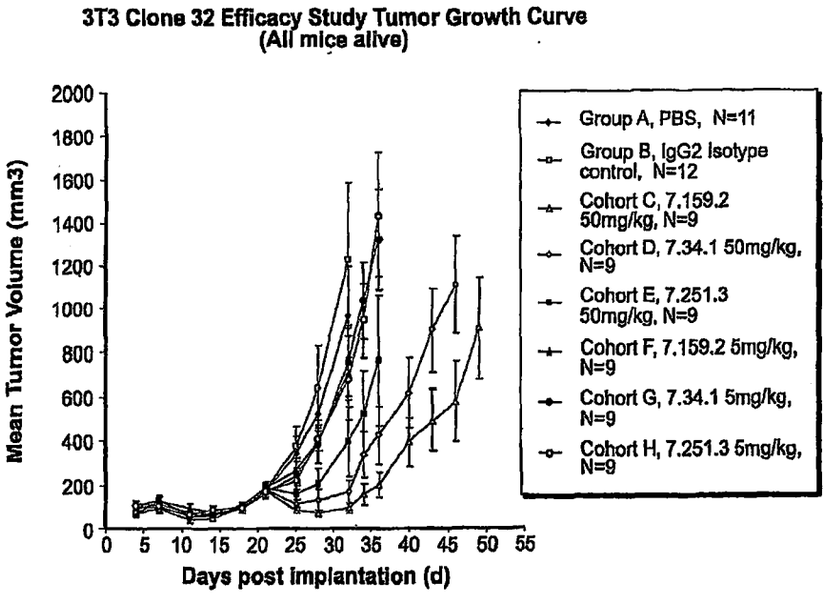
(74) Agent: **FULLER, Michael, L.**; Knobbe Martens Olson & Bear LLP, 2040 Main Street, Fourteenth Floor, Irvine, California 92614 (US).

(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, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, 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).

[Continued on next page]

(54) Title: BINDING PROTEINS SPECIFIC FOR INSULIN-LIKE GROWTH FACTORS AND USES THEREOF



(57) Abstract: Binding proteins, such as antibodies directed to IGF-II with cross-reactivity to IGF-I and uses of such antibodies are described. In particular, fully human monoclonal antibodies directed to the IGF-II with cross-reactivity to IGF-I are disclosed. Also discussed are nucleotide sequences encoding, and amino acid sequences comprising, heavy and light chain immunoglobulin molecules, particularly sequences corresponding to contiguous heavy and light chain sequences spanning the framework regions and/or complementarity determining regions (CDR's), specifically from FR1 through FR4 or CDR1 through CDR3.

WO 2007/070432 A2

Declaration under Rule 4.17:

— *of inventorship (Rule 4.17(iv))*

Published:

— *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.

BINDING PROTEINS SPECIFIC FOR INSULIN-LIKE GROWTH FACTORS AND USES THEREOF

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

[0001] This application claims priority under 35 U.S.C. § 119 to U.S. Provisional Application Serial No. 60/750,085, filed December 13, 2005; U.S. Provisional Application Serial No. 60/750,772, filed December 14, 2005; U.S. Provisional Application Serial No. 60/774,747, filed February 17, 2005; and U.S. Provisional Application Serial No. 60/808,183, filed May 24, 2006, each of which is incorporated herein by reference in its entirety.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention

[0002] The invention relates to binding proteins that bind to insulin-like growth factor-2 (IGF-II) with cross-reactivity to insulin-like growth factor-1 (IGF-I) and uses of such binding proteins. More specifically, the invention relates to monoclonal antibodies directed to IGF-II with cross-reactivity to IGF-I and uses of these antibodies. Aspects of the invention also relate to hybridomas or other cell lines expressing such antibodies.

Description of the Related Art

[0003] Insulin-like growth factor IGF-I and IGF-II are small polypeptides involved in regulating cell proliferation, survival, differentiation and transformation. IGFs exert their various actions by primarily interacting with a specific cell surface receptor, the IGF-I receptor (IGF-IR) and activating various intracellular signaling cascades. IGFs circulate in serum mostly bound to IGF-binding proteins (IGFBP-1 to 6). The interaction of IGFs with the IGF-IR is regulated by the IGFBPs, and IGFs can only bind to the IGF-IR once released from the IGFBPs (mostly by proteolysis of the IGFBPs). IGF-I can also bind to a hybrid receptor comprised of IGF-IR and insulin receptor (IR) subunits. IGF-II has been shown to bind to the "A" isoform of the insulin receptor.

[0004] Malignant transformation involves the imbalance of diverse processes such as cell growth, differentiation, apoptosis, and transformation. IGF-I and IGF-II have

been implicated in the pathophysiology of a wide range of conditions, and are thought to play a role in tumorigenesis due to the mitogenic and antiapoptotic properties mediated by the receptor IGF-IR. LeRoith and Roberts, *Cancer Lett.* **195**:127-137 (2003).

[0005] IGF-I was discovered as a growth factor produced by the liver under the regulatory control of pituitary growth hormone and was originally designated somatomedin-C. Salmon *et al., J. Lab. Clin. Med.* **49**:825-826 (1957). Both IGF-I and IGF-II are expressed ubiquitously and act as endocrine, paracrine, and autocrine growth factors, through their interaction with the IGF-IR, a trans-membrane tyrosine kinase that is structurally and functionally related to the insulin receptor (IR). IGF-I functions primarily by activating the IGF-IR, whereas IGF-II can act through either the IGF-IR or through the IR-A isoform. LeRoith and Roberts, Cancer Lett. **195**:127-137 (2003). Additionally, the interaction of both IGF-I and IGF-II with the IGF-binding proteins may affect the half-life and bioavailability of the IGFs, as well as their direct interaction with receptors in some cases. Rajaram *et al., Endocr. Rev.* **18**:801-831 (1997).

[0006] IGF-I has a long-term impact on cell proliferation, differentiation, and apoptosis. Experiments in cultured osteosarcoma and breast cancer cells suggested that IGF-I is a potent mitogen and exerts its mitogenic action by increasing DNA synthesis and by stimulating the expression of cyclin D1, which accelerates progression of the cell cycle from G_1 to S phase. Furlanetto *et al., Mol. Endocrinol.* **8**:510-517 (1994); Dufourny *et al., J. Biol. Chem.* **272**:311663-31171 (1997). Suppression of cyclin D1 expression in pancreatic cancer cells abolished the mitogenic effect of IGF-I. Kornmann *et al., J. Clin. Invest.* **101**:344-352 (1998). In addition to stimulating cell cycle progression, IGF-I also inhibits apoptosis. IGF-I was shown to stimulate the expression of Bcl proteins and to suppress expression of Bax, which results in an increase in the relative amount of the Bcl/Bax heterodimer, thereby blocking initiation of the apoptotic pathway. Minshall *et al., J. Immunol.* **159**:1225-1232 (1997); Parrizas *et al., Endocrinology* **138**:1355-1358 (1997); Wang *et al., Endocrinology* **139**:1354-1360 (1998).

[0007] Like IGF-I, IGF-II also has mitogenic and antiapoptotic actions and regulates cell proliferation and differentiation. Compared with IGF-I, high concentrations of IGF-II circulate in serum. High serum IGF-II concentrations have been found in patients with colorectal cancer, with a trend towards higher concentrations in advanced disease. Renehan *et al., Br. J. Cancer* **83**:1344-1350. Additionally, most primary tumors and transformed cell lines overexpress IGF-II mRNA and protein. Werner and LeRoith *Adv. Cancer Res.* **68**:183-223 (1996). Overexpression of IGF-II in colon cancer is

associated with an aggressive phenotype, and the loss of imprinting (loss of allele-specific expression) of the IGF-II gene may be important in colorectal carcinogenesis. Michell *et al.*, *Br. J. Cancer* **76**:60-66 (1997); Takano et al., *Oncology* **59**:210-216 (2000). Cancer cells with a strong tendency to metastasize have four-fold higher levels of IGF-II expression than those cells with a low ability to metastasize. Guerra *et al.*, *Int. J. Cancer* **65**:812-820 (1996).

[0008] Research and clinical studies have highlighted the role of the IGF family members in the development, maintenance and progression of cancer. Many cancer cells have been shown to overexpress the IGF-IR and/or the IGF ligands. For example, IGF-I and IGF-II are strong mitogens for a wide variety of cancer cell lines, including sarcoma, leukemia, and cancers of the prostate, breast, lung, colon, stomach, esophagus, liver, pancreas, kidney, thyroid, brain, ovary, and uterus. Macaulay *et al.*, *Br. J. Cancer* **65**:311-320 (1992); Oku *et al.*, *Anticancer Res.* **11**:1591-1595 (1991); LeRoith *et al.*, *Ann. Intern. Med.* 122:54-59 (1995); Yaginuma *et al.*, *Oncology* **54**:502-507 (1997); Singh *et al.*, *Endocrinology* **137**:1764-1774 (1996); Frostad *et al.*, *Eur. J. Haematol* **62**:191-198 (1999). When IGF-I was administered to malignant colon cancer cells, they became resistant to cytokine-induced apoptosis. Remacle-Bonnet *et al.*, *Cancer Res.* **60**:2007-2017 (2000).

[0009] The role of IGFs in cancer is also supported by epidemiologic studies, which showed that high levels of circulating IGF-I and low levels of IGFBP-3 are associated with an increased risk for development of several common cancers (prostate, breast, colorectal and lung). Mantzoros *et al.*, *Br. J. Cancer* **76**:1115-1118 (1997); Hankinson *et al.*, *Lancet* **351**:1393-1396 (1998); Ma *et al.*, *J. Natl.Cancer Inst.* **91**:620-625 (1999); Karasik *et al.*, *J. Clin. Endocrinol Metab.* **78**:271-276 (1994). These results suggest that IGF-I and IGF-II act as powerful mitogenic and anti-apoptotic signals, and that their overexpression correlates with poor prognosis in patients with several types of cancer.

[0010] Using knockout mouse models, several studies have further established the role of IGFs in tumor growth. With the development of the technology for tissue specific, conditional gene deletion, a mouse model of liver IGF-I deficiency (LID) was developed. Liver-specific deletion of the *igf1* gene abrogated expression of IGF-I mRNA and caused a dramatic reduction in circulating IGF-I levels. Yakar *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:7324-7329 (1999). When mammary tumors were induced in the LID mouse, reduced circulating IGF-1 levels resulted in significant reductions in cancer

development, growth, and metastases, whereas increased circulating IGF-1 levels were associated with enhanced tumor growth. Wu *et al.*, *Cancer Res.* **63**:4384-4388 (2003).

[0011] Several papers have reported that inhibition of IGF-IR expression and/or signaling leads to inhibition of tumor growth, both *in vitro* and *in vivo*. Inhibition of IGF signaling has also been shown to increase the susceptibility of tumor cells to chemotherapeutic agents. A variety of strategies (antisense oligonucleotides, soluble receptor, inhibitory peptides, dominant negative receptor mutants, small molecules inhibiting the kinase activity and anti-hIGF-IR antibodies) have been developed to inhibit the IGF-IR signaling pathway in tumor cells. One approach has been to target the kinase activity of IGF-IR with small molecule inhibitors. Two compounds were recently identified as small molecule kinase inhibitors capable of selectively inhibiting the IGF-IR. Garcia-Echeverria *et al.*, *Cancer Cell* **5**:231-239 (2004); Mitsiades *et al.*, *Cancer Cell* **5**:221-230 (2004). Inhibition of IGF-IR kinase activity abrogated IGF-I-mediated survival and colony formation in soft agar of MCF-7 human breast cancer cells. Garcia-Echeverria *et al.*, *Cancer Cell* **5**:231-239 (2004). When an IGF-IR kinase inhibitor was administered to mice bearing tumor xenografts, IGF-IR signaling in tumor xenografts was inhibited and the growth of IGF-IR-driven fibrosarcomas was significantly reduced. Garcia-Echeverria *et al.*, *Cancer Cell* 5:231-239 (2004). A similar effect was observed on hematologic malignancies, especially multiple myeloma. In multiple myeloma cells, a small molecule IGF-IR kinase inhibitor demonstrated a >16-fold greater potency against the IGF-1R, as compared to the insulin receptor, and was similarly effective in inhibiting cell growth and survival. Mitsiades *et al.*, *Cancer Cell* **5**:221-230 (2004). The same compound was injected intraperitoneally into mice and inhibited multiple myeloma cell growth and enhanced survival of the mice. Mitsiades *et al.*, *Cancer Cell* **5**:221-230 (2004). When combined with other chemotherapeutics at subtherapeutic doses, inhibition of IGF-IR kinase activity synergistically reduced tumor burden. Mitsiades *et al.*, *Cancer Cell* **5**:221-230 (2004).

[0012] Another approach to inhibit IGF signaling has been the development of neutralizing antibodies directed against the receptor IGF-IR. Various groups have developed antibodies to IGF-IR that inhibit receptor IGF-I-stimulated autophosphorylation, induce receptor internalization and degradation, and reduce proliferation and survival of diverse human cancer cell lines. Hailey *et al.*, *Mol Cancer Ther.* **1**:1349-1353 (2002); Maloney *et al.*, *Cancer Res.* **63**:5073-5083 (2003); Benini *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 7:1790-1797 (2001); Burtrum *et al.*, *Cancer Res.* **63**:8912-8921

(2003). Additionally, in xenograft tumor models, IGF-IR blockade resulted in significant growth inhibition of breast, renal and pancreatic tumors *in vivo*. Burtrum *et al.*, *Cancer Res.* **63**:8912-8921 (2003); Maloney *et al.*, *Cancer Res.* **63**:5073-5083 (2003). Experiments utilizing chimeric humanized IGF-IR antibodies yielded similar results, inhibiting growth of breast cancer cells *in vitro* and in tumor xenografts. Sachdev et al., Cancer Res. 63:627-635 (2003). Other humanized IGF-IR antibodies blocked IGF-I-induced tyrosine phosphorylation and growth inhibition in breast and non small cell lung tumors, as well as *in vivo*. Cohen *et al.*, *Clin. Cancer Res.* **11**:2063-2073 (2005); Goetsch *et al.*, *Int. J. Cancer* **113**:316-328 (2005).

[0013] Increased IGF-I levels have also been associated with several non-cancerous pathological conditions, including acromegaly and gigantism (Barkan, Cleveland Clin. J. Med. 65: 343, 347-349, 1998), while abnormal IGF-I/IGF-II receptor function has been implicated in psoriasis (Wraight et al., Nat. Biotech. 18: 521-526, 2000), atherosclerosis and smooth muscle restenosis of blood vessels following angioplasty (Bayes-Genis et al., Circ. Res. 86: 125-130, 2000). Increased IGF-I levels have been implicated in diabetes or in complications associated with diabetes, such as microvascular proliferation (Smith et al., Nat. Med. 5: 1390-1395, 1999).

[0014] Antibodies to IGF-I and IGF-II have been disclosed in the art. See, for example, Goya *et al.*, *Cancer Res.* **64**:6252-6258 (2004); Miyamoto *et al.*, *Clin. Cancer Res.* **11**:3494-3502 (2005). Additionally, see WO 05/18671, WO 05/28515 and WO 03/93317.

SUMMARY

[0015] Embodiments of the invention relate to binding proteins that specifically bind to insulin-like growth factors and reduce tumor growth. In one embodiment, the binding proteins are fully human monoclonal antibodies, or binding fragments thereof that specifically bind to insulin-like growth factors and reduce tumor growth. Mechanisms by which this can be achieved can include and are not limited to either inhibition of binding of IGF-I/II to its receptor IGF-IR, inhibition of IGF-I/II-induced IGF-IR signaling, or increased clearance of IGF-I/II, therein reducing the effective concentration of IGF-I/II.

[0016] Thus, some embodiments provide a fully human isolated specific binding protein that preferentially binds to insulin-like growth factor-II (IGF-II) with cross-reactivity to insulin-like growth factor I (IGF-I) and neutralizes IGF-I and IGF-II

activity. In certain aspects, the binding protein binds to IGF-II with at least 2.5 times greater affinity than to IGF-I. In other aspects, the binding protein binds to IGF-II with at least 3, at least 4, at least 5, at least 7, at least 10, at least 50, at least 60, at least 100 or at least 150 times greater affinity than to IGF-I.

[0017] In some embodiments, the specific binding protein has an EC_{50} of no more than 15 nM for inhibiting IGF-I-dependent IGF-I receptor phosphorylation in NIH3T3 cells expressing IGF-1R ectopically. In some aspects, the specific binding protein has an EC_{50} of no more than 15 nM, no more than 10 nM, or no more than 8 nM for inhibiting IGF-I-dependent IGF-I receptor phosphorylation in NIH3T3 cells expressing IGF-1R ectopically.

[0018] In some embodiments, the specific binding protein has an EC_{50} of no more than 5 nM, no more than 4 nM, or no more than 3 nM for inhibiting IGF-II-dependent IGF-I receptor phosphorylation in NIH3T3 cells expressing IGF-1R ectopically.

[0019] In other embodiments, the specific binding protein inhibits greater than 70% of IGF-II dependent proliferation of NIH3T3 cells that express recombinant hIGF-IR with an EC_{50} of no more than 25 nM, no more than 20 nM, no more than 15 nM, or no more than 10 nM.

[0020] In other embodiments, the specific binding protein inhibits greater than 70% of IGF-I dependent proliferation of NIH3T3 cells that express recombinant hIGF-IR with an EC_{50} of no more than 40 nM, no more than 30 nM, or no more than 25 nM.

[0021] In certain embodiments, the specific binding protein competes for binding with a monoclonal antibody comprising a variable heavy chain sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO.: 2, SEQ ID NO.: 6, SEQ ID NO.: 10, SEQ ID NO.: 14 and SEQ ID NO.: 18, and comprising a variable light chain sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO.: 4, SEQ ID NO.: 8, SEQ ID NO.: 12 and SEQ ID NO.: 16.

[0022] One embodiment of the invention is a fully human antibody that binds to IGF-I with a Kd less than 500 picomolar (pM). More preferably, the antibody binds with a Kd less than 450 picomolar (pM). More preferably, the antibody binds with a Kd less than 410 picomolar (pM). More preferably, the antibody binds with a K_d of less than 350 pM. Even more preferably, the antibody binds with a K_d of less than 300 pM. Affinity and/or avidity measurements can be measured by BIACORE®, as described herein.

[0023] Yet another embodiment of the invention is a fully human monoclonal antibody that binds to IGF-II with a K_d of less than 175 picomolar (pM). More preferably, the antibody binds with a Kd less than 100 picomolar (pM). More preferably, the antibody binds with a Kd less than 50 picomolar (pM). More preferably, the antibody binds with a Kd less than 5 picomolar (pM). Even more preferably, the antibody binds with a K_d of less than 2 pM.

[0024] In certain embodiments, the specific binding protein is a fully human monoclonal antibody or a binding fragment of a fully human monoclonal antibody. The binding fragments can include fragments such as Fab, Fab' or $F(ab')_2$ and Fv.

[0025] One embodiment of the invention comprises fully human monoclonal antibodies 7.251.3 (ATCC Accession Number PTA-7422), 7.34.1 (ATCC Accession Number PTA-7423) and 7.159.2 (ATCC Accession Number PTA-7424) which specifically bind to IGF-I/II, as discussed in more detail below.

[0026] In some embodiments the specific binding protein that binds to insulin-like growth factor-II (IGF-II) with cross-reactivity to insulin-like growth factor-I (IGF-I), or binding fragment thereof can include a heavy chain polypeptide having the sequence of SEQ ID NO.: 6, and a light chain polypeptide having the sequence of SEQ ID NO.: 8.

[0027] The specific binding protein can include a heavy chain polypeptide having the sequence of SEQ ID NO.: 10, and a light chain polypeptide having the sequence of SEQ ID NO.: 12.

[0028] The specific binding protein of the invention can include heavy chain polypeptide having the sequence of SEQ ID NO.: 14 and a light chain polypeptide having the sequence of SEQ ID NO.: 16.

[0029] In certain embodiments, the specific binding protein can be in a mixture with a pharmaceutically acceptable carrier.

[0030] Another embodiment includes isolated nucleic acid molecules encoding any of the specific binding proteins described herein, vectors having isolated nucleic acid molecules encoding the specific binding proteins, or a host cell transformed with any of such nucleic acid molecules and vectors.

[0031] In certain embodiments the specific binding protein that binds to insulin-like growth factor-II (IGF-II) with cross-reactivity to insulin-like growth factor-I (IGF-I), or binding fragment thereof does not bind specifically to IGF-II or IGF-I proteins when said proteins are bound to Insulin Growth Factor Binding Proteins.

[0032] Further embodiments include methods of determining the level of insulin-like growth factor-II (IGF-II) and insulin-like growth factor I (IGF-I) in a patient sample. These methods can include providing a patient sample; contacting the sample with a specific binding protein that binds to insulin-like growth factor-II (IGF-II) with cross-reactivity to insulin-like growth factor-I (IGF-I), or binding fragment thereof; and determining the level of IGF-I and IGF-II in said sample. In some aspects, the patient sample is blood.

[0033] Additional embodiments include methods of treating a malignant tumor in a mammal. These methods can include selecting a mammal in need of treatment for a malignant tumor; and administering to the mammal a therapeutically effective dose of a specific binding protein that binds to insulin-like growth factor-II (IGF-II) with cross-reactivity to insulin-like growth factor-I (IGF-I), or binding fragment thereof. In some aspects the animal is human. In some aspects the binding protein is a fully human monoclonal antibody, and is selected from the group consisting of mAb 7.251.3 (ATCC Accession Number PTA-7422), mAb 7.34.1 (ATCC Accession Number PTA-7423), and mAb 7.159.2 (ATCC Accession Number PTA-7424).

[0034] Treatable diseases can include melanoma, non-small cell lung cancer, glioma, hepatocellular (liver) carcinoma, thyroid tumor, gastric (stomach) cancer, prostrate cancer, breast cancer, ovarian cancer, bladder cancer, lung cancer, glioblastoma, endometrial cancer, kidney cancer, colon cancer, pancreatic cancer, and epidermoid carcinoma.

[0035] Additional embodiments include methods of treating a growth factor-dependent disease in a mammal. These methods include selecting a mammal in need of treatment for a growth factor-dependent disease; and administering to said mammal a therapeutically effective dose of a specific binding protein that binds to insulin-like growth factor-II (IGF-II) with cross-reactivity to insulin-like growth factor-I (IGF-I), or binding fragment thereof. In some aspects, the mammal can be human. In some aspects the binding protein is a fully human monoclonal antibody, and is selected from the group consisting of mAb 7.251.3 (ATCC Accession Number PTA-7422), mAb 7.34.1 (ATCC Accession Number PTA-7423), and mAb 7.159.2 (ATCC Accession Number PTA-7424).

[0036] Treatable growth factor-dependent diseases can include osteoporosis, diabetes, and cardiovascular diseases. Other treatable disease conditions include acromegaly and gigantism, psoriasis, atherosclerosis and smooth muscle restenosis of blood vessels, as well as diabetes.

[0037] Additional embodiments include a conjugate comprising a fully human monoclonal antibody that binds to insulin-like growth factor-II (IGF-II) with cross-reactivity to insulin-like growth factor-I (IGF-I), or a binding fragment thereof and a therapeutic agent. In some aspects the therapeutic agent can be a toxin, a radioisotope, or a pharmaceutical composition.

[0038] In other embodiments, the invention provides fully human monoclonal antibodies, or binding fragment thereof, that bind to insulin-like growth factor-II (IGF-II) with cross-reactivity to insulin-like growth factor-I (IGF-I), and comprise a heavy chain complementarity determining region 1 (CDR1) having the amino acid sequence of "Ser Tyr Tyr Trp Ser" (SEQ ID NO: 21); a heavy chain complementarity determining region 2 (CDR2) having the amino acid sequence of "Tyr Phe Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser" (SEQ ID NO: 22); and a heavy chain complementarity determining region 3 (CDR3) having the amino acid sequence of "Ile Thr Gly Thr Thr Lys Gly Gly Met Asp Val" (SEQ ID NO: 23).

[0039] Further embodiments include fully human monoclonal antibodies, or binding fragment thereof, having a light chain complementarity determining region 1 (CDR1) having the amino acid sequence of "Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His" (SEQ ID NO: 24). Antibodies herein can also include a light chain complementarity determining region 2 (CDR2) having the amino acid sequence of "Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser" (SEQ ID NO: 25); and a light chain complementarity determining region 3 (CDR3) having the amino acid sequence of "Gln Ser Phe Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val" (SEQ ID NO: 26).

[0040] In other embodiments, the invention provides fully human monoclonal antibodies, or binding fragment thereof, that bind to insulin-like growth factor-II (IGF-II) with cross-reactivity to insulin-like growth factor-I (IGF-I), and comprise a heavy chain complementarity determining region 1 (CDR1) having the amino acid sequence of "Ser Tyr Tyr Trp Ser" (SEQ ID NO: 27); a heavy chain complementarity determining region 2 (CDR2) having the amino acid sequence of "Tyr Phe Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser" (SEQ ID NO: 28); and a heavy chain complementarity determining region 3 (CDR3) having the amino acid sequence of "Ile Thr Gly Thr Thr Lys Gly Gly Met Asp Val" (SEQ ID NO: 29).

[0041] Further embodiments include fully human monoclonal antibodies, or binding fragment thereof, having a light chain complementarity determining region 1 (CDR1) having the amino acid sequence of "Thr Gly Arg Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly

Tyr Asp Val His" (SEQ ID NO: 30); a light chain complementarity determining region 2 (CDR2) having the amino acid sequence of "Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser" (SEQ ID NO: 31); and a light chain complementarity determining region 3 (CDR3) having the amino acid sequence of "Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val" (SEQ ID NO: 32).

[0042] In other embodiments, the invention provides fully human monoclonal antibodies, or binding fragment thereof, that bind to insulin-like growth factor-II (IGF-II) with cross-reactivity to insulin-like growth factor-I (IGF-I), and comprise a heavy chain complementarity determining region 1 (CDR1) having the amino acid sequence of "Ser Tyr Asp Ile Asn" (SEQ ID NO: 33); a heavy chain complementarity determining region 2 (CDR2) having the amino acid sequence of "Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly" (SEQ ID NO: 34); and a heavy chain complementarity determining region 3 (CDR3) having the amino acid sequence of "Asp Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val" (SEQ ID NO: 35).

[0043] Further embodiments include fully human monoclonal antibodies, or binding fragment thereof, having a light chain complementarity determining region 1 (CDR1) having the amino acid sequence of "Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Glu Asn Asn His Val Ser" (SEQ ID NO: 36); a light chain complementarity determining region 2 (CDR2) having the amino acid sequence of "Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser" (SEQ ID NO: 37); and a light chain complementarity determining region 3 (CDR3) having the amino acid sequence of "Glu Thr Trp Asp Thr Ser Leu Ser Ala Gly Arg Val" (SEQ ID NO: 38).

[0044] In other embodiments, the invention provides fully human monoclonal antibodies, or binding fragment thereof, that bind to insulin-like growth factor-II (IGF-II) with cross-reactivity to insulin-like growth factor-I (IGF-I), and comprise a heavy chain complementarity determining region 1 (CDR1) having the amino acid sequence of "Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly" (SEQ ID NO: 81); a heavy chain complementarity determining region 2 (CDR2) having the amino acid sequence of "Gly Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser" (SEQ ID NO: 82); and a heavy chain complementarity determining region 3 (CDR3) having the amino acid sequence of "Gln Arg Gly His Ser Ser Gly Trp Trp Tyr Phe Asp Leu" (SEQ ID NO: 83).

[0045] Further embodiments include fully human monoclonal antibodies, or binding fragment thereof, having a light chain complementarity determining region 1 (CDR1) having the amino acid sequence of "Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Ala" (SEQ ID NO: 84); a light chain complementarity determining region 2 (CDR2)

having the amino acid sequence of "Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser" (SEQ ID NO: 85); and a light chain complementarity determining region 3 (CDR3) having the amino acid sequence of "Gln Gln Ala Asn Asn Phe Pro Phe Thr" (SEQ ID NO: 86).

[0046] In other embodiments, the invention provides fully human monoclonal antibodies, or binding fragment thereof, that bind to insulin-like growth factor-II (IGF-II) with cross-reactivity to insulin-like growth factor-I (IGF-I), and comprise a heavy chain complementarity determining region 1 (CDR1) having the amino acid sequence of "Ser Ser Ser Asn Tyr Trp Gly" (SEQ ID NO: 87); a heavy chain complementarity determining region 2 (CDR2) having the amino acid sequence of "Gly Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser" (SEQ ID NO: 88); and a heavy chain complementarity determining region 3 (CDR3) having the amino acid sequence of "Gln Arg Gly His Ser Ser Gly Trp Trp Tyr Phe Asp Leu" (SEQ ID NO: 89).

[0047] Further embodiments include fully human monoclonal antibodies, or binding fragment thereof, having a light chain complementarity determining region 1 (CDR1) having the amino acid sequence of "Arg Ala Ser Arg Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala" (SEQ ID NO: 90); a light chain complementarity determining region 2 (CDR2) having the amino acid sequence of "Thr Ala Ser Ser Leu Gln Ser" (SEQ ID NO: 91); and a light chain complementarity determining region 3 (CDR3) having the amino acid sequence of "Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe Thr" (SEQ ID NO: 92).

[0048] Some embodiments provide the use of the specific binding proteins described herein in the preparation of a medicament for the treatment of a malignant tumor. In some aspects, the specific binding protein can be a fully human monoclonal antibody. In certain aspects, the binding protein is mAb 7.251.3 (ATCC Accession Number PTA-7422) or mAb 7.34.1 (ATCC Accession Number PTA-7423) or mAb 7.159.2 (ATCC Accession Number PTA-7424). In some aspects, the medicament is for use in combination with a second anti-neoplastic agent selected from the group consisting of an antibody, a chemotherapeutic agent, and a radioactive drug. In some aspects, the medicament is for use in conjunction with or following a conventional surgery, a bone marrow stem cell transplantation or a peripheral stem cell transplantation.

[0049] The malignant tumor can be melanoma, non-small cell lung cancer, glioma, hepatocellular (liver) carcinoma, thyroid tumor, gastric (stomach) cancer, prostrate cancer, breast cancer, ovarian cancer, bladder cancer, lung cancer, glioblastoma, endometrial cancer, kidney cancer, colon cancer, pancreatic cancer, and epidermoid carcinoma, for example.

[0050] Other embodiments provide the use of the specific binding proteins described herein in the preparation of a medicament for the treatment of a growth factor-dependent disease. In some aspects, the specific binding protein is a fully human monoclonal antibody and can be selected from the group consisting of mAb 7.251.3 (ATCC Accession Number PTA-7422), mAb 7.34.1 (ATCC Accession Number PTA-7423), and mAb 7.159.2 (ATCC Accession Number PTA-7424).

[0051] The growth factor-dependent disease can be osteoporosis, diabetes, and cardiovascular diseases, for example.

[0052] Preferably, the antibody comprises a heavy chain amino acid sequence having a complementarity determining region (CDR) with one or more of the sequences shown in Table 11. For example, the antibody can comprise a heavy chain amino acid sequence having the CDR1, CDR2, or CDR3 of one or more of the sequences shown in Table 11, or a combination thereof. It is noted that those of ordinary skill in the art can readily accomplish CDR determinations. See for example, Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest,* Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

[0053] Embodiments of the invention described herein relate to monoclonal antibodies that bind IGF-I/II and affect IGF-I/II function. Other embodiments relate to fully human anti-IGF-I/II antibodies and anti-IGF-I/II antibody preparations with desirable properties from a therapeutic perspective, including high binding affinity for IGF-I/II, the ability to neutralize IGF-I/II *in vitro* and *in vivo*, and the ability to inhibit IGF-I/II induced cell proliferation.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0054] Figure 1 is a graph showing inhibition of xenograft tumor growth in nude mice of NIH3T3 cells expressing IGF-II and IGF-IR (Clone 32 cells) with mAbs 7.159.2, 7.34.1, 7.251.3 compared to IgG2 and PBS controls. Mean tumor volume is shown on the y-axis and time after implantation is shown on the x-axis.

[0055] Figure 2 is a graph showing body weight in Clone 32 xenograft mice treated with mAbs 7.159.2, 7.34.1, 7.251.3 compared to IgG2 and PBS controls. Mean body weight is shown on the y-axis and time after implantation is shown on the x-axis.

[0056] Figure 3 is a graph showing inhibition of xenograft tumor growth in nude mice of NIH3T3 cells expressing IGF-I and IGF-IR (P12 cells) with mAb 7.159.2

compared to PBS control. Mean tumor volume is shown on the y-axis and time after implantation (indicated by date) is shown on the x-axis.

DETAILED DESCRIPTION

[0057] Embodiments of the invention described herein relate to binding proteins that specifically bind to IGF-II with cross reactivity to IGF-I (referred to herein as "IGFI/II"). In some embodiments, the binding proteins are antibodies, or binding fragments thereof, and bind to IGF-II with cross-reactivity to IGF-I and inhibit the binding of these proteins to their receptor, IGF-IR. Other embodiments of the invention include fully human neutralizing anti-IGF-I/II antibodies, and antibody preparations that are therapeutically useful and bind both insulin-like growth factors. Such anti-IGF-I/II antibody preparations preferably have desirable therapeutic properties, including strong binding affinity for IGF-I/II, the ability to neutralize IGF-I/II *in vitro*, and the ability to inhibit IGF-I/II-induced cell proliferation *in vivo*.

[0058] Embodiments of the invention also include isolated binding fragments of anti-IGF-I/II antibodies. Preferably, the binding fragments are derived from fully human anti-IGF-I/II antibodies. Exemplary fragments include Fv, Fab' or other well know antibody fragments, as described in more detail below. Embodiments of the invention also include cells that express fully human antibodies against IGF-I/II. Examples of cells include hybridomas, or recombinantly created cells, such as Chinese hamster ovary (CHO) cells that produce antibodies against IGF-I/II.

[0059] In addition, embodiments of the invention include methods of using these antibodies for treating diseases. Anti-IGF-I/II antibodies are useful for preventing IGF-I/II mediated IGF-I/II signal transduction, thereby inhibiting cell proliferation. The mechanism of action of this inhibition may include inhibition of IGF-I/II from binding to its receptor, IGF-IR, inhibition of IGF-I/II induced IGF-IR signaling, or enhanced clearance of IGF-I/II therein lowering the effective concentration of IGF-I/II for binding to IGF-IR. Diseases that are treatable through this inhibition mechanism include, but are not limited to, neoplastic diseases, such as, melanoma, non-small cell lung cancer, glioma, hepatocellular (liver) carcinoma, gynecologic tumors, head and neck cancer, esophageal cancer, glioblastoma, and cancers and tumors of the thyroid, stomach, prostrate, breast, ovary, bladder, lung, uterus, kidney, colon, and pancreas, salivary gland, and colorectum.

[0060] Other embodiments of the invention include diagnostic assays for specifically determining the quantity of IGF-I/II in a biological sample. The assay kit can include anti-IGF-I/II antibodies along with the necessary labels for detecting such antibodies. These diagnostic assays are useful to screen for growth factor-related diseases including, but not limited to, neoplastic diseases, such as, melanoma, non-small cell lung cancer, glioma, hepatocellular (liver) carcinoma, gynecologic tumors, head and neck cancer, esophageal cancer, glioblastoma, and carcinoma of the thyroid, stomach, prostrate, breast, ovary, bladder, lung, uterus, kidney, colon, and pancreas, salivary gland, and colorectum. Other non-neoplastic disease conditions may include acromegaly and gigantism, psoriasis, osteoporosis, atherosclerosis and smooth muscle restenosis of blood vessels, as well as diabetes.

[0061] Further embodiments, features, and the like regarding anti-IGF-I/II antibodies are provided in additional detail below.

Sequence Listing

[0062] Embodiments of the invention include the specific anti-IGF-I/II antibodies listed below in Table 1. This table reports the identification number of each anti-IGF-I/II antibody, along with the SEQ ID number of the corresponding heavy chain and light chain genes. Further, the germline sequences from which each heavy chain and light chain derive are also provided below in Table 1.

[0063] Each antibody has been given an identification number that includes either two or three numbers separated by one or two decimal points. In some cases, several clones of one antibody were prepared. Although the clones have the identical nucleic acid and amino acid sequences as the parent sequence, they may also be listed separately, with the clone number indicated by the number to the right of a second decimal point. Thus, for example, the nucleic acid and amino acid sequences of antibody 7.159.2 are identical to the sequences of antibody 7.159.1.

[0064] As can be seen by comparing the sequences in the sequence listing, SEQ ID NOs.: 1-20 differ from SEQ ID NOs.: 39-58 because SEQ ID NOs.: 39-58 include the untranslated, signal peptide, and constant domain regions for each sequenced heavy or light chain.

TABLE 1

mAb ID No.:	Sequence	SEQ ID NO:
7.158.1	Nucleotide sequence encoding the variable region of the heavy chain	1
	Amino acid sequence encoding the variable region of the heavy chain	2
	Nucleotide sequence encoding the variable region of the light chain	3
	Amino acid sequence encoding the variable region of the light chain	4
7.159.2	Nucleotide sequence encoding the variable region of the heavy chain	5
	Amino acid sequence encoding the variable region of the heavy chain	6
	Nucleotide sequence encoding the variable region of the light chain	7
	Amino acid sequence encoding the variable region of the light chain	8
7.34.1	Nucleotide sequence encoding the variable region of the heavy chain	9
	Amino acid sequence encoding the variable region of the heavy chain	10
	Nucleotide sequence encoding the variable region of the light chain	11
	Amino acid sequence encoding the variable region of the light chain	12
7.251.3	Nucleotide sequence encoding the variable region of the heavy chain	13
	Amino acid sequence encoding the variable region of the heavy chain	14
	Nucleotide sequence encoding the variable region of the light chain	15
	Amino acid sequence encoding the variable region of the light chain	16
7.234.1	Nucleotide sequence encoding the variable region of the heavy chain	17
	Amino acid sequence encoding the variable region of the heavy chain	18
	Nucleotide sequence encoding the variable region of the light chain	19
	Amino acid sequence encoding the variable region of the light chain	20
7.158.1	Nucleotide sequence encoding the variable region of the heavy chain	39
	Amino acid sequence encoding the variable region of the heavy chain	40
	Nucleotide sequence encoding the variable region of the light chain	41
	Amino acid sequence encoding the variable region of the light chain	42
7.159.2	Nucleotide sequence encoding the variable region of the heavy chain	43
	Amino acid sequence encoding the variable region of the heavy chain	44
	Nucleotide sequence encoding the variable region of the light chain	45
	Amino acid sequence encoding the variable region of the light chain	46
7.34.1	Nucleotide sequence encoding the variable region of the heavy chain	47
	Amino acid sequence encoding the variable region of the heavy chain	48
	Nucleotide sequence encoding the variable region of the light chain	49
	Amino acid sequence encoding the variable region of the light chain	50
7.251.3	Nucleotide sequence encoding the variable region of the heavy chain	51
	Amino acid sequence encoding the variable region of the heavy chain	52
	Nucleotide sequence encoding the variable region of the light chain	53
	Amino acid sequence encoding the variable region of the light chain	54
7.234.1	Nucleotide sequence encoding the variable region of the heavy chain	55
	Amino acid sequence encoding the variable region of the heavy chain	56
	Nucleotide sequence encoding the variable region of the light chain	57
	Amino acid sequence encoding the variable region of the light chain	58
Germline (7.158.1)	Nucleotide sequence encoding the variable region of the heavy chain	59
	Amino acid sequence encoding the variable region of the heavy chain	60
	Nucleotide sequence encoding the variable region of the light chain	61

	Amino acid sequence encoding the variable region of the light chain	62
Germline (7.159.1)	Nucleotide sequence encoding the variable region of the heavy chain	63
	Amino acid sequence encoding the variable region of the heavy chain	64
	Nucleotide sequence encoding the variable region of the light chain	65
	Amino acid sequence encoding the variable region of the light chain	66
Germline (7.34.1)	Nucleotide sequence encoding the variable region of the heavy chain	67
	Amino acid sequence encoding the variable region of the heavy chain	68
	Nucleotide sequence encoding the variable region of the light chain	69
	Amino acid sequence encoding the variable region of the light chain	70
Germline (7.251.3)	Nucleotide sequence encoding the variable region of the heavy chain	71
	Amino acid sequence encoding the variable region of the heavy chain	72
	Nucleotide sequence encoding the variable region of the light chain	73
	Amino acid sequence encoding the variable region of the light chain	74

Definitions

[0065] Unless otherwise defined, scientific and technical terms used herein shall have the meanings that are commonly understood by those of ordinary skill in the art. Further, unless otherwise required by context, singular terms shall include pluralities and plural terms shall include the singular. Generally, nomenclatures utilized in connection with, and techniques of, cell and tissue culture, molecular biology, and protein and oligo- or polynucleotide chemistry and hybridization described herein are those well known and commonly used in the art.

[0066] Standard techniques are used for recombinant DNA, oligonucleotide synthesis, and tissue culture and transformation (e.g., electroporation, lipofection). Enzymatic reactions and purification techniques are performed according to manufacturer's specifications or as commonly accomplished in the art or as described herein. The foregoing techniques and procedures are generally performed according to conventional methods well known in the art and as described in various general and more specific references that are cited and discussed throughout the present specification. *See e.g.,* Sambrook *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)), which is incorporated herein by reference. The nomenclatures utilized in connection with, and the laboratory procedures and techniques of, analytical chemistry, synthetic organic chemistry, and medicinal and pharmaceutical chemistry described herein are those well known and commonly used in the art. Standard techniques are used for chemical syntheses, chemical analyses, pharmaceutical preparation, formulation, and delivery, and treatment of patients.

[0067] As utilized in accordance with the present disclosure, the following terms, unless otherwise indicated, shall be understood to have the following meanings:

[0068] The term "IGF-I" refers to the molecule Insulin-like growth factor-I, and the term "IGF-II" refers to the molecule Insulin-like growth factor-II. The term "IGF-I/II" refers to both molecules Insulin-like growth factors-I and -II, and relates to the preferential binding to IGF-II with cross-reactivity to IGF-I. Thus, an antibody that binds to IGF-I/II will preferentially bind to IGF-II, but would cross-react with IGF-I, binding to IGF-II with higher affinity than to IGF-I. For example, the antibody can bind to IGF-II with 2.5 times greater affinity than to IGF-I. In certain embodiments, the antibody can bind to IGF-II with at least 5, at least 10, at least 25, at least 50 or at least 150 times greater affinity than to IGF-I.

[0069] The term "neutralizing" when referring to an antibody relates to the ability of an antibody to eliminate, or significantly reduce, the activity of a target antigen. Accordingly, a "neutralizing" anti-IGF-I/II antibody is capable of eliminating or significantly reducing the activity of IGF-I/II. A neutralizing IGF-I/II antibody may, for example, act by blocking the binding of IGF-I/II to its receptor IGF-IR. By blocking this binding, the IGF-IR mediated signal transduction is significantly, or completely, eliminated. Ideally, a neutralizing antibody against IGF-I/II inhibits cell proliferation.

[0070] The term "isolated polynucleotide" as used herein shall mean a polynucleotide that has been isolated from its naturally occurring environment. Such polynucleotides may be genomic, cDNA, or synthetic. Isolated polynucleotides preferably are not associated with all or a portion of the polynucleotides they associate with in nature. The isolated polynucleotides may be operably linked to another polynucleotide that it is not linked to in nature. In addition, isolated polynucleotides preferably do not occur in nature as part of a larger sequence.

[0071] The term "isolated protein" referred to herein means a protein that has been isolated from its naturally occurring environment. Such proteins may be derived from genomic DNA, cDNA, recombinant DNA, recombinant RNA, or synthetic origin or some combination thereof, which by virtue of its origin, or source of derivation, the "isolated protein" (1) is not associated with proteins found in nature, (2) is free of other proteins from the same source, e.g. free of murine proteins, (3) is expressed by a cell from a different species, or (4) does not occur in nature.

[0072] The term "polypeptide" is used herein as a generic term to refer to native protein, fragments, or analogs of a polypeptide sequence. Hence, native protein,

fragments, and analogs are species of the polypeptide genus. Preferred polypeptides in accordance with the invention comprise the human heavy chain immunoglobulin molecules and the human kappa light chain immunoglobulin molecules, as well as antibody molecules formed by combinations comprising the heavy chain immunoglobulin molecules with light chain immunoglobulin molecules, such as the kappa or lambda light chain immunoglobulin molecules, and vice versa, as well as fragments and analogs thereof. Preferred polypeptides in accordance with the invention may also comprise solely the human heavy chain immunoglobulin molecules or fragments thereof.

[0073] The term "naturally-occurring" as used herein as applied to an object refers to the fact that an object can be found in nature. For example, a polypeptide or polynucleotide sequence that is present in an organism (including viruses) that can be isolated from a source in nature and which has not been intentionally modified by man in the laboratory or otherwise is naturally-occurring.

[0074] The term "operably linked" as used herein refers to positions of components so described that are in a relationship permitting them to function in their intended manner. For example, a control sequence "operably linked" to a coding sequence is connected in such a way that expression of the coding sequence is achieved under conditions compatible with the control sequences.

[0075] The term "polynucleotide" as referred to herein means a polymeric form of nucleotides of at least 10 bases in length, either ribonucleotides or deoxynucleotides or a modified form of either type of nucleotide, or RNA-DNA hetero-duplexes. The term includes single and double stranded forms of DNA.

[0076] The term "oligonucleotide" referred to herein includes naturally occurring, and modified nucleotides linked together by naturally occurring, and non-naturally occurring linkages. Oligonucleotides are a polynucleotide subset generally comprising a length of 200 bases or fewer. Preferably, oligonucleotides are 10 to 60 bases in length and most preferably 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, or 20 to 40 bases in length. Oligonucleotides are usually single stranded, e.g. for probes; although oligonucleotides may be double stranded, e.g. for use in the construction of a gene mutant. Oligonucleotides can be either sense or antisense oligonucleotides.

[0077] The term "naturally occurring nucleotides" referred to herein includes deoxyribonucleotides and ribonucleotides. The term "modified nucleotides" referred to herein includes nucleotides with modified or substituted sugar groups and the like. The term "oligonucleotide linkages" referred to herein includes oligonucleotides linkages such

as phosphorothioate, phosphorodithioate, phosphoroselenoate, phosphorodiselenoate, phosphoroanilothioate, phosphoraniladate, phosphoroamidate, and the like. *See e.g.*, LaPlanche *et al. Nucl. Acids Res.* 14:9081 (1986); Stec *et al. J. Am. Chem. Soc.* 106:6077 (1984); Stein *et al. Nucl. Acids Res.* 16:3209 (1988); Zon *et al. Anti-Cancer Drug Design* 6:539 (1991); Zon *et al. Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec *et al.* U.S. Patent No. 5,151,510; Uhlmann and Peyman *Chemical Reviews* 90:543 (1990), the disclosures of which are hereby incorporated by reference. An oligonucleotide can include a label for detection, if desired.

[0078] The term "selectively hybridize" referred to herein means to detectably and specifically bind. Polynucleotides, oligonucleotides and fragments thereof selectively hybridize to nucleic acid strands under hybridization and wash conditions that minimize appreciable amounts of detectable binding to nonspecific nucleic acids. High stringency conditions can be used to achieve selective hybridization conditions as known in the art and discussed herein. Generally, the nucleic acid sequence homology between the polynucleotides, oligonucleotides, or antibody fragments and a nucleic acid sequence of interest will be at least 80%, and more typically with preferably increasing homologies of at least 85%, 90%, 95%, 99%, and 100%.

[0079] Two amino acid sequences are "homologous" if there is a partial or complete identity between their sequences. For example, 85% homology means that 85% of the amino acids are identical when the two sequences are aligned for maximum matching. Gaps (in either of the two sequences being matched) are allowed in maximizing matching; gap lengths of 5 or less are preferred with 2 or less being more preferred. Alternatively and preferably, two protein sequences (or polypeptide sequences derived from them of at least about 30 amino acids in length) are homologous, as this term is used herein, if they have an alignment score of at more than 5 (in standard deviation units) using the program ALIGN with the mutation data matrix and a gap penalty of 6 or greater. *See* Dayhoff, M.O., in *Atlas of Protein Sequence and Structure*, pp. 101-110 (Volume 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) and Supplement 2 to this volume, pp. 1-10. The two sequences or parts thereof are more preferably homologous if their amino acids are greater than or equal to 50% identical when optimally aligned using the ALIGN program. It should be appreciated that there can be differing regions of homology within two orthologous sequences. For example,

the functional sites of mouse and human orthologues may have a higher degree of homology than non-functional regions.

[0080] The term "corresponds to" is used herein to mean that a polynucleotide sequence is homologous (i.e., is identical, not strictly evolutionarily related) to all or a portion of a reference polynucleotide sequence, or that a polypeptide sequence is identical to a reference polypeptide sequence.

[0081] In contradistinction, the term "complementary to" is used herein to mean that the complementary sequence is homologous to all or a portion of a reference polynucleotide sequence. For illustration, the nucleotide sequence "TATAC" corresponds to a reference sequence "TATAC" and is complementary to a reference sequence "GTATA".

[0082] The following terms are used to describe the sequence relationships between two or more polynucleotide or amino acid sequences: "reference sequence", "comparison window", "sequence identity", "percentage of sequence identity", and "substantial identity". A "reference sequence" is a defined sequence used as a basis for a sequence comparison. A reference sequence may be a subset of a larger sequence, for example, as a segment of a full-length cDNA or gene sequence given in a sequence listing or may comprise a complete cDNA or gene sequence. Generally, a reference sequence is at least 18 nucleotides or 6 amino acids in length, frequently at least 24 nucleotides or 8 amino acids in length, and often at least 48 nucleotides or 16 amino acids in length. Since two polynucleotides or amino acid sequences may each (1) comprise a sequence (i.e., a portion of the complete polynucleotide or amino acid sequence) that is similar between the two molecules, and (2) may further comprise a sequence that is divergent between the two polynucleotides or amino acid sequences, sequence comparisons between two (or more) molecules are typically performed by comparing sequences of the two molecules over a "comparison window" to identify and compare local regions of sequence similarity. A "comparison window", as used herein, refers to a conceptual segment of at least about 18 contiguous nucleotide positions or about 6 amino acids wherein the polynucleotide sequence or amino acid sequence is compared to a reference sequence of at least 18 contiguous nucleotides or 6 amino acid sequences and wherein the portion of the polynucleotide sequence in the comparison window may include additions, deletions, substitutions, and the like (i.e., gaps) of 20 percent or less as compared to the reference sequence (which does not comprise additions or deletions) for optimal alignment of the two sequences. Optimal alignment of sequences for aligning a comparison window may

be conducted by the local homology algorithm of Smith and Waterman *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), by the homology alignment algorithm of Needleman and Wunsch *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), by the search for similarity method of Pearson and Lipman *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 85:2444 (1988), by computerized implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), GENEWORKS™, or MACVECTOR® software packages), or by inspection, and the best alignment (i.e., resulting in the highest percentage of homology over the comparison window) generated by the various methods is selected.

[0083] The term "sequence identity" means that two polynucleotide or amino acid sequences are identical (i.e., on a nucleotide-by-nucleotide or residue-by-residue basis) over the comparison window. The term "percentage of sequence identity" is calculated by comparing two optimally aligned sequences over the window of comparison, determining the number of positions at which the identical nucleic acid base (e.g., A, T, C, G, U, or I) or amino acid residue occurs in both sequences to yield the number of matched positions, dividing the number of matched positions by the total number of positions in the comparison window (i.e., the window size), and multiplying the result by 100 to yield the percentage of sequence identity. The terms "substantial identity" as used herein denotes a characteristic of a polynucleotide or amino acid sequence, wherein the polynucleotide or amino acid comprises a sequence that has at least 85 percent sequence identity, preferably at least 90 to 95 percent sequence identity, more preferably at least 99 percent sequence identity, as compared to a reference sequence over a comparison window of at least 18 nucleotide (6 amino acid) positions, frequently over a window of at least 24-48 nucleotide (8-16 amino acid) positions, wherein the percentage of sequence identity is calculated by comparing the reference sequence to the sequence which may include deletions or additions which total 20 percent or less of the reference sequence over the comparison window. The reference sequence may be a subset of a larger sequence.

[0084] As used herein, the twenty conventional amino acids and their abbreviations follow conventional usage. *See Immunology - A Synthesis* (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), which is incorporated herein by reference. Stereoisomers (e.g., D-amino acids) of the twenty conventional amino acids, unnatural amino acids such as α-, α-disubstituted amino acids,

N-alkyl amino acids, lactic acid, and other unconventional amino acids may also be suitable components for polypeptides of the present invention. Examples of unconventional amino acids include: 4-hydroxyproline, γ-carboxyglutamate, ε-N,N,N-trimethyllysine, ε-N-acetyllysine, O-phosphoserine, N-acetylserine, N-formylmethionine, 3-methylhistidine, 5-hydroxylysine, σ-N-methylarginine, and other similar amino acids and imino acids (e.g., 4-hydroxyproline). In the polypeptide notation used herein, the left-hand direction is the amino terminal direction and the right-hand direction is the carboxy-terminal direction, in accordance with standard usage and convention.

[0085] Similarly, unless specified otherwise, the left-hand end of single-stranded polynucleotide sequences is the 5' end; the left-hand direction of double-stranded polynucleotide sequences is referred to as the 5' direction. The direction of 5' to 3' addition of nascent RNA transcripts is referred to as the transcription direction; sequence regions on the DNA strand having the same sequence as the RNA and which are 5' to the 5' end of the RNA transcript are referred to as "upstream sequences"; sequence regions on the DNA strand having the same sequence as the RNA and which are 3' to the 3' end of the RNA transcript are referred to as "downstream sequences".

[0086] As applied to polypeptides, the term "substantial identity" means that two peptide sequences, when optimally aligned, such as by the programs GAP or BESTFIT using default gap weights, share at least 80 percent sequence identity, preferably at least 90 percent sequence identity, more preferably at least 95 percent sequence identity, and most preferably at least 99 percent sequence identity. Preferably, residue positions that are not identical differ by conservative amino acid substitutions. Conservative amino acid substitutions refer to the interchangeability of residues having similar side chains. For example, a group of amino acids having aliphatic side chains is glycine, alanine, valine, leucine, and isoleucine; a group of amino acids having aliphatic-hydroxyl side chains is serine and threonine; a group of amino acids having amide-containing side chains is asparagine and glutamine; a group of amino acids having aromatic side chains is phenylalanine, tyrosine, and tryptophan; a group of amino acids having basic side chains is lysine, arginine, and histidine; and a group of amino acids having sulfur-containing side chains is cysteine and methionine. Preferred conservative amino acids substitution groups are: valine-leucine-isoleucine, phenylalanine-tyrosine, lysine-arginine, alanine-valine, glutamic-aspartic, and asparagine-glutamine.

[0087] As discussed herein, minor variations in the amino acid sequences of antibodies or immunoglobulin molecules are contemplated as being encompassed by the present invention, providing that the variations in the amino acid sequence maintain at least 75%, more preferably at least 80%, 90%, 95%, and most preferably 99% sequence identity to the antibodies or immunoglobulin molecules described herein. In particular, conservative amino acid replacements are contemplated. Conservative replacements are those that take place within a family of amino acids that have related side chains. Genetically encoded amino acids are generally divided into families: (1) acidic=aspartate, glutamate; (2) basic=lysine, arginine, histidine; (3) non-polar=alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan; and (4) uncharged polar=glycine, asparagine, glutamine, cysteine, serine, threonine, tyrosine. More preferred families are: serine and threonine are an aliphatic-hydroxy family; asparagine and glutamine are an amide-containing family; alanine, valine, leucine and isoleucine are an aliphatic family; and phenylalanine, tryptophan, and tyrosine are an aromatic family. For example, it is reasonable to expect that an isolated replacement of a leucine with an isoleucine or valine, an aspartate with a glutamate, a threonine with a serine, or a similar replacement of an amino acid with a structurally related amino acid will not have a major effect on the binding function or properties of the resulting molecule, especially if the replacement does not involve an amino acid within a framework site. Whether an amino acid change results in a functional peptide can readily be determined by assaying the specific activity of the polypeptide derivative. Assays are described in detail herein. Fragments or analogs of antibodies or immunoglobulin molecules can be readily prepared by those of ordinary skill in the art. Preferred amino- and carboxy-termini of fragments or analogs occur near boundaries of functional domains. Structural and functional domains can be identified by comparison of the nucleotide and/or amino acid sequence data to public or proprietary sequence databases. Preferably, computerized comparison methods are used to identify sequence motifs or predicted protein conformation domains that occur in other proteins of known structure and/or function. Methods to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure are known. Bowie *et al. Science* 253:164 (1991). Thus, the foregoing examples demonstrate that those of skill in the art can recognize sequence motifs and structural conformations that may be used to define structural and functional domains in accordance with the antibodies described herein.

[0088] Preferred amino acid substitutions are those which: (1) reduce susceptibility to proteolysis, (2) reduce susceptibility to oxidation, (3) alter binding affinity for forming protein complexes, (4) alter binding affinities, and (5) confer or modify other physicochemical or functional properties of such analogs. Analogs can include various muteins of a sequence other than the naturally-occurring peptide sequence. For example, single or multiple amino acid substitutions (preferably conservative amino acid substitutions) may be made in the naturally-occurring sequence (preferably in the portion of the polypeptide outside the domain(s) forming intermolecular contacts. A conservative amino acid substitution should not substantially change the structural characteristics of the parent sequence (e.g., a replacement amino acid should not tend to break a helix that occurs in the parent sequence, or disrupt other types of secondary structure that characterizes the parent sequence). Examples of art-recognized polypeptide secondary and tertiary structures are described in *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); and Thornton et at. *Nature* 354:105 (1991), which are each incorporated herein by reference.

[0089] The term "polypeptide fragment" as used herein refers to a polypeptide that has an amino-terminal and/or carboxy-terminal deletion, but where the remaining amino acid sequence is identical to the corresponding positions in the naturally-occurring sequence deduced, for example, from a full-length cDNA sequence. Fragments typically are at least 5, 6, 8 or 10 amino acids long, preferably at least 14 amino acids long, more preferably at least 20 amino acids long, usually at least 50 amino acids long, and even more preferably at least 70 amino acids long. The term "analog" as used herein refers to polypeptides which are comprised of a segment of at least 25 amino acids that has substantial identity to a portion of a deduced amino acid sequence and which has at least one of the following properties: (1) specific binding to IGF-I/II, under suitable binding conditions, (2) ability to block appropriate IGF-I/II binding, or (3) ability to inhibit IGF-I/II activity. Typically, polypeptide analogs comprise a conservative amino acid substitution (or addition or deletion) with respect to the naturally-occurring sequence. Analogs typically are at least 20 amino acids long, preferably at least 50 amino acids long or longer, and can often be as long as a full-length naturally-occurring polypeptide.

[0090] Peptide analogs are commonly used in the pharmaceutical industry as non-peptide drugs with properties analogous to those of the template peptide. These

types of non-peptide compound are termed "peptide mimetics" or "peptidomimetics". Fauchere, *J. Adv. Drug Res.* 15:29 (1986); Veber and Freidinger *TINS* p.392 (1985); and Evans *et al. J. Med. Chem.* 30:1229 (1987), which are incorporated herein by reference. Such compounds are often developed with the aid of computerized molecular modeling. Peptide mimetics that are structurally similar to therapeutically useful peptides may be used to produce an equivalent therapeutic or prophylactic effect. Generally, peptidomimetics are structurally similar to a paradigm polypeptide (i.e., a polypeptide that has a biochemical property or pharmacological activity), such as human antibody, but have one or more peptide linkages optionally replaced by a linkage selected from the group consisting of: --CH_2NH--, --CH_2S--, --CH_2-CH_2--, --CH=CH--(cis and trans), --$COCH_2$--, --$CH(OH)CH_2$--, and --CH_2SO--, by methods well known in the art. Systematic substitution of one or more amino acids of a consensus sequence with a D-amino acid of the same type (e.g., D-lysine in place of L-lysine) may be used to generate more stable peptides. In addition, constrained peptides comprising a consensus sequence or a substantially identical consensus sequence variation may be generated by methods known in the art (Rizo and Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992), incorporated herein by reference); for example, by adding internal cysteine residues capable of forming intramolecular disulfide bridges which cyclize the peptide.

[0091] As used herein, the term "antibody" refers to a polypeptide or group of polypeptides that are comprised of at least one binding domain that is formed from the folding of polypeptide chains having three-dimensional binding spaces with internal surface shapes and charge distributions complementary to the features of an antigenic determinant of an antigen. An antibody typically has a tetrameric form, comprising two identical pairs of polypeptide chains, each pair having one "light" and one "heavy" chain. The variable regions of each light/heavy chain pair form an antibody binding site.

[0092] "Binding fragments" of an antibody are produced by recombinant DNA techniques, or by enzymatic or chemical cleavage of intact antibodies. Binding fragments include Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, and single-chain antibodies. An antibody other than a "bispecific" or "bifunctional" antibody is understood to have each of its binding sites identical. An antibody substantially inhibits adhesion of a receptor to a counterreceptor when an excess of antibody reduces the quantity of receptor bound to counterreceptor by at least about 20%, 40%, 60% or 80%, and more usually greater than about 85% (as measured in an *in vitro* competitive binding assay).

[0093] As used herein, a "binding protein" or a "specific binding protein" are proteins that specifically bind to a target molecule. Antibodies, and binding fragments of antibodies, are binding proteins.

[0094] The term "epitope" includes any protein determinant capable of specific binding to an immunoglobulin or T-cell receptor. Epitopic determinants usually consist of chemically active surface groupings of molecules such as amino acids or sugar side chains and may, but not always, have specific three-dimensional structural characteristics, as well as specific charge characteristics. An antibody is said to specifically bind an antigen when the dissociation constant is ≤ 1 μM, preferably $\leq$ 100 nM and most preferably $\leq$ 10 nM.

[0095] The term "agent" is used herein to denote a chemical compound, a mixture of chemical compounds, a biological macromolecule, or an extract made from biological materials.

[0096] "Active" or "activity" in regard to an IGF-I/II polypeptide refers to a portion of an IGF-I/II polypeptide that has a biological or an immunological activity of a native IGF-I/II polypeptide. "Biological" when used herein refers to a biological function that results from the activity of the native IGF-I/II polypeptide. A preferred IGF-I/II biological activity includes, for example, IGF-I/II induced cell proliferation.

[0097] "Mammal" when used herein refers to any animal that is considered a mammal. Preferably, the mammal is human.

[0098] Digestion of antibodies with the enzyme, papain, results in two identical antigen-binding fragments, known also as "Fab" fragments, and a "Fc" fragment, having no antigen-binding activity but having the ability to crystallize. Digestion of antibodies with the enzyme, pepsin, results in the a $F(ab')_2$ fragment in which the two arms of the antibody molecule remain linked and comprise two-antigen binding sites. The $F(ab')_2$ fragment has the ability to crosslink antigen.

[0099] "Fv" when used herein refers to the minimum fragment of an antibody that retains both antigen-recognition and antigen-binding sites.

[0100] "Fab" when used herein refers to a fragment of an antibody that comprises the constant domain of the light chain and the CH1 domain of the heavy chain.

[0101] The term "mAb" refers to monoclonal antibody.

[0102] "Liposome" when used herein refers to a small vesicle that may be useful for delivery of drugs that may include the IGF-I/II polypeptide of the invention or antibodies to such an IGF-I/II polypeptide to a mammal.

[0103] "Label" or "labeled" as used herein refers to the addition of a detectable moiety to a polypeptide, for example, a radiolabel, fluorescent label, enzymatic label chemiluminescent labeled or a biotinyl group. Radioisotopes or radionuclides may include ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, fluorescent labels may include rhodamine, lanthanide phosphors or FITC and enzymatic labels may include horseradish peroxidase, β-galactosidase, luciferase, alkaline phosphatase.

[0104] The term "pharmaceutical agent or drug" as used herein refers to a chemical compound or composition capable of inducing a desired therapeutic effect when properly administered to a patient. Other chemistry terms herein are used according to conventional usage in the art, as exemplified by *The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)), (incorporated herein by reference).

[0105] As used herein, "substantially pure" means an object species is the predominant species present (i.e., on a molar basis it is more abundant than any other individual species in the composition), and preferably a substantially purified fraction is a composition wherein the object species comprises at least about 50 percent (on a molar basis) of all macromolecular species present. Generally, a substantially pure composition will comprise more than about 80 percent of all macromolecular species present in the composition, more preferably more than about 85%, 90%, 95%, and 99%. Most preferably, the object species is purified to essential homogeneity (contaminant species cannot be detected in the composition by conventional detection methods) wherein the composition consists essentially of a single macromolecular species.

[0106] The term "patient" includes human and veterinary subjects.

Human Antibodies and Humanization of Antibodies

[0107] Human antibodies avoid some of the problems associated with antibodies that possess murine or rat variable and/or constant regions. The presence of such murine or rat derived proteins can lead to the rapid clearance of the antibodies or can lead to the generation of an immune response against the antibody by a patient. In order to avoid the utilization of murine or rat derived antibodies, fully human antibodies can be generated through the introduction of functional human antibody loci into a rodent, other

mammal or animal so that the rodent, other mammal or animal produces fully human antibodies.

[0108] One method for generating fully human antibodies is through the use of XenoMouse® strains of mice that have been engineered to contain up to but less than 1000 kb-sized germline configured fragments of the human heavy chain locus and kappa light chain locus. *See* Mendez *et al. Nature Genetics* 15:146-156 (1997) and Green and Jakobovits *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998). The XenoMouse® strains are available from Abgenix, Inc. (Fremont, CA).

[0109] The production of the XenoMouse® strains of mice is further discussed and delineated in U.S. Patent Application Serial Nos. 07/466,008, filed January 12, 1990, 07/610,515, filed November 8, 1990, 07/919,297, filed July 24, 1992, 07/922,649, filed July 30, 1992, 08/031,801, filed March 15, 1993, 08/112,848, filed August 27, 1993, 08/234,145, filed April 28, 1994, 08/376,279, filed January 20, 1995, 08/430, 938, filed April 27, 1995, 08/464,584, filed June 5, 1995, 08/464,582, filed June 5, 1995, 08/463,191, filed June 5, 1995, 08/462,837, filed June 5, 1995, 08/486,853, filed June 5, 1995, 08/486,857, filed June 5, 1995, 08/486,859, filed June 5, 1995, 08/462,513, filed June 5, 1995, 08/724,752, filed October 2, 1996, 08/759,620, filed December 3, 1996, U.S. Publication 2003/0093820, filed November 30, 2001 and U.S. Patent Nos. 6,162,963, 6,150,584, 6,114,598, 6,075,181, and 5,939,598 and Japanese Patent Nos. 3 068 180 B2, 3 068 506 B2, and 3 068 507 B2. *See also* European Patent No., EP 0 463 151 B1, grant published June 12, 1996, International Patent Application No., WO 94/02602, published February 3, 1994, International Patent Application No., WO 96/34096, published October 31, 1996, WO 98/24893, published June 11, 1998, WO 00/76310, published December 21, 2000. The disclosures of each of the above-cited patents, applications, and references are hereby incorporated by reference in their entirety.

[0110] In an alternative approach, others, including GenPharm International, Inc., have utilized a "minilocus" approach. In the minilocus approach, an exogenous Ig locus is mimicked through the inclusion of pieces (individual genes) from the Ig locus. Thus, one or more V_H genes, one or more D_H genes, one or more J_H genes, a mu constant region, and usually a second constant region (preferably a gamma constant region) are formed into a construct for insertion into an animal. This approach is described in U.S. Patent No. 5,545,807 to Surani *et al.* and U.S. Patent Nos. 5,545,806, 5,625,825, 5,625,126, 5,633,425, 5,661,016, 5,770,429, 5,789,650, 5,814,318, 5,877,397, 5,874,299,

and 6,255,458 each to Lonberg and Kay, U.S. Patent No. 5,591,669 and 6,023.010 to Krimpenfort and Berns, U.S. Patent Nos. 5,612,205, 5,721,367, and 5,789,215 to Berns *et al.*, and U.S. Patent No. 5,643,763 to Choi and Dunn, and GenPharm International U.S. Patent Application Serial Nos. 07/574,748, filed August 29, 1990, 07/575,962, filed August 31, 1990, 07/810,279, filed December 17, 1991, 07/853,408, filed March 18, 1992, 07/904,068, filed June 23, 1992, 07/990,860, filed December 16, 1992, 08/053,131, filed April 26, 1993, 08/096,762, filed July 22, 1993, 08/155,301, filed November 18, 1993, 08/161,739, filed December 3, 1993, 08/165,699, filed December 10, 1993, 08/209,741, filed March 9, 1994, the disclosures of which are hereby incorporated by reference. *See also* European Patent No. 0 546 073 B1, International Patent Application Nos. WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852, and WO 98/24884 and U.S. Patent No. 5,981,175, the disclosures of which are hereby incorporated by reference in their entirety. *See further* Taylor *et al.*, 1992, Chen *et al.*, 1993, Tuaillon *et al.*, 1993, Choi *et al.*, 1993, Lonberg *et al.*, (1994), Taylor *et al.*, (1994), and Tuaillon *et al.*, (1995), Fishwild *et al.*, (1996), the disclosures of which are hereby incorporated by reference in their entirety.

[0111] Kirin has also demonstrated the generation of human antibodies from mice in which, through microcell fusion, large pieces of chromosomes, or entire chromosomes, have been introduced. *See* European Patent Application Nos. 773 288 and 843 961, the disclosures of which are hereby incorporated by reference. Additionally, KM™– mice, which are the result of cross-breeding of Kirin's Tc mice with Medarex's minilocus (Humab) mice have been generated. These mice possess the human IgH transchromosome of the Kirin mice and the kappa chain transgene of the Genpharm mice (Ishida *et al.*, Cloning Stem Cells, (2002) 4:91-102).

[0112] Human antibodies can also be derived by in vitro methods. Suitable examples include but are not limited to phage display (CAT, Morphosys, Dyax, Biosite/Medarex, Xoma, Symphogen, Alexion (formerly Proliferon), Affimed) ribosome display (CAT), yeast display, and the like.

Preparation of Antibodies

[0113] Antibodies, as described herein, were prepared through the utilization of the XenoMouse® technology, as described below. Such mice, then, are capable of

producing human immunoglobulin molecules and antibodies and are deficient in the production of murine immunoglobulin molecules and antibodies. Technologies utilized for achieving the same are disclosed in the patents, applications, and references disclosed in the background section herein. In particular, however, a preferred embodiment of transgenic production of mice and antibodies therefrom is disclosed in U.S. Patent Application Serial No. 08/759,620, filed December 3, 1996 and International Patent Application Nos. WO 98/24893, published June 11, 1998 and WO 00/76310, published December 21, 2000, the disclosures of which are hereby incorporated by reference. *See also* Mendez *et al. Nature Genetics* **15**:146-156 (1997), the disclosure of which is hereby incorporated by reference.

[0114] Through the use of such technology, fully human monoclonal antibodies to a variety of antigens have been produced. Essentially, XenoMouse® lines of mice are immunized with an antigen of interest (e.g. IGF-I/II), lymphatic cells (such as B-cells) are recovered from the hyper-immunized mice, and the recovered lymphocytes are fused with a myeloid-type cell line to prepare immortal hybridoma cell lines. These hybridoma cell lines are screened and selected to identify hybridoma cell lines that produced antibodies specific to the antigen of interest. Provided herein are methods for the production of multiple hybridoma cell lines that produce antibodies specific to IGF-I/II. Further, provided herein are characterization of the antibodies produced by such cell lines, including nucleotide and amino acid sequence analyses of the heavy and light chains of such antibodies.

[0115] Alternatively, instead of being fused to myeloma cells to generate hybridomas, B cells can be directly assayed. For example, CD19+ B cells can be isolated from hyperimmune XenoMouse® mice and allowed to proliferate and differentiate into antibody-secreting plasma cells. Antibodies from the cell supernatants are then screened by ELISA for reactivity against the IGF-I/II immunogen. The supernatants might also be screened for immunoreactivity against fragments of IGF-I/II to further map the different antibodies for binding to domains of functional interest on IGF-I/II. The antibodies may also be screened against other related human chemokines and against the rat, the mouse, and non-human primate, such as cynomolgus monkey, orthologues of IGF-I/II, the last to determine species cross-reactivity. B cells from wells containing antibodies of interest may be immortalized by various methods including fusion to make hybridomas either from individual or from pooled wells, or by infection with EBV or transfection by known

immortalizing genes and then plating in suitable medium. Alternatively, single plasma cells secreting antibodies with the desired specificities are then isolated using an IGF-I/II-specific hemolytic plaque assay (Babcook *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-48 (1996)). Cells targeted for lysis are preferably sheep red blood cells (SRBCs) coated with the IGF-I/II antigen.

[0116] In the presence of a B-cell culture containing plasma cells secreting the immunoglobulin of interest and complement, the formation of a plaque indicates specific IGF-I/II-mediated lysis of the sheep red blood cells surrounding the plasma cell of interest. The single antigen-specific plasma cell in the center of the plaque can be isolated and the genetic information that encodes the specificity of the antibody is isolated from the single plasma cell. Using reverse-transcription followed by PCR (RT-PCR), the DNA encoding the heavy and light chain variable regions of the antibody can be cloned. Such cloned DNA can then be further inserted into a suitable expression vector, preferably a vector cassette such as a pcDNA, more preferably such a pcDNA vector containing the constant domains of immunglobulin heavy and light chain. The generated vector can then be transfected into host cells, e.g., HEK293 cells, CHO cells, and cultured in conventional nutrient media modified as appropriate for inducing transcription, selecting transformants, or amplifying the genes encoding the desired sequences.

[0117] In general, antibodies produced by the fused hybridomas were human IgG2 heavy chains with fully human kappa or lambda light chains. Antibodies described herein possess human IgG4 heavy chains as well as IgG2 heavy chains. Antibodies can also be of other human isotypes, including IgG1. The antibodies possessed high affinities, typically possessing a Kd of from about 10^{-6} through about 10^{-12} M or below, when measured by solid phase and solution phase techniques. Antibodies possessing a KD of at least 10^{-11} M are preferred to inhibit the activity of IGF-I/II.

[0118] As will be appreciated, anti-IGF-I/II antibodies can be expressed in cell lines other than hybridoma cell lines. Sequences encoding particular antibodies can be used to transform a suitable mammalian host cell. Transformation can be by any known method for introducing polynucleotides into a host cell, including, for example packaging the polynucleotide in a virus (or into a viral vector) and transducing a host cell with the virus (or vector) or by transfection procedures known in the art, as exemplified by U.S. Patent Nos. 4,399,216, 4,912,040, 4,740,461, and 4,959,455 (which patents are hereby incorporated herein by reference). The transformation procedure used depends upon the host to be transformed. Methods for introducing heterologous polynucleotides

into mammalian cells are well known in the art and include dextran-mediated transfection, calcium phosphate precipitation, polybrene mediated transfection, protoplast fusion, electroporation, encapsulation of the polynucleotide(s) in liposomes, and direct microinjection of the DNA into nuclei.

[0119] Mammalian cell lines available as hosts for expression are well known in the art and include many immortalized cell lines available from the American Type Culture Collection (ATCC), including but not limited to Chinese hamster ovary (CHO) cells, HeLa cells, baby hamster kidney (BHK) cells, monkey kidney cells (COS), human hepatocellular carcinoma cells (e.g., Hep G2), human epithelial kidney 293 cells, and a number of other cell lines. Cell lines of particular preference are selected through determining which cell lines have high expression levels and produce antibodies with constitutive IGF-I/II binding properties.

[0120] Anti-IGF-I/II antibodies are useful in the detection of IGF-I/II in patient samples and accordingly are useful as diagnostics for disease states as described herein. In addition, based on their ability to significantly neutralize IGF-I/II activity (as demonstrated in the Examples below), anti-IGF-I/II antibodies have therapeutic effects in treating symptoms and conditions resulting from IGF-I/II expression. In specific embodiments, the antibodies and methods herein relate to the treatment of symptoms resulting from IGF-I/II induced cell proliferation. Further embodiments involve using the antibodies and methods described herein to treat diseases including neoplastic diseases, such as, melanoma, non-small cell lung cancer, glioma, hepatocellular (liver) carcinoma, thyroid tumor, gastric (stomach) cancer, prostrate cancer, breast cancer, ovarian cancer, bladder cancer, lung cancer, glioblastoma, endometrial cancer, kidney cancer, colon cancer, gynecologic tumors, head and neck cancer, esophageal cancer, and pancreatic cancer. Other non-neoplastic disease conditions may include acromegaly and gigantism, psoriasis, osteoporosis, atherosclerosis and smooth muscle restenosis of blood vessels, as well as diabetes.

Therapeutic Administration and Formulations

[0121] Embodiments of the invention include sterile pharmaceutical formulations of anti-IGF-I/II antibodies that are useful as treatments for diseases. Such formulations would inhibit the binding of IGF-I/II to its receptor IGF-IR, thereby effectively treating pathological conditions where, for example, serum or tissue IGF-I/II

is abnormally elevated. Anti-IGF-I/II antibodies preferably possess adequate affinity to potently neutralize IGF-I/II, and preferably have an adequate duration of action to allow for infrequent dosing in humans. A prolonged duration of action will allow for less frequent and more convenient dosing schedules by alternate parenteral routes such as subcutaneous or intramuscular injection.

[0122] Sterile formulations can be created, for example, by filtration through sterile filtration membranes, prior to or following lyophilization and reconstitution of the antibody. The antibody ordinarily will be stored in lyophilized form or in solution. Therapeutic antibody compositions generally are placed into a container having a sterile access port, for example, an intravenous solution bag or vial having an adapter that allows retrieval of the formulation, such as a stopper pierceable by a hypodermic injection needle.

[0123] The route of antibody administration is in accord with known methods, e.g., injection or infusion by intravenous, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial, intrathecal, inhalation or intralesional routes, or by sustained release systems as noted below. The antibody is preferably administered continuously by infusion or by bolus injection.

[0124] An effective amount of antibody to be employed therapeutically will depend, for example, upon the therapeutic objectives, the route of administration, and the condition of the patient. Accordingly, it is preferred that the therapist titer the dosage and modify the route of administration as required to obtain the optimal therapeutic effect. Typically, the clinician will administer antibody until a dosage is reached that achieves the desired effect. The progress of this therapy is easily monitored by conventional assays or by the assays described herein.

[0125] Antibodies, as described herein, can be prepared in a mixture with a pharmaceutically acceptable carrier. This therapeutic composition can be administered intravenously or through the nose or lung, preferably as a liquid or powder aerosol (lyophilized). The composition may also be administered parenterally or subcutaneously as desired. When administered systemically, the therapeutic composition should be sterile, pyrogen-free and in a parenterally acceptable solution having due regard for pH, isotonicity, and stability. These conditions are known to those skilled in the art. Briefly, dosage formulations of the compounds described herein are prepared for storage or administration by mixing the compound having the desired degree of purity with physiologically acceptable carriers, excipients, or stabilizers. Such materials are non-

toxic to the recipients at the dosages and concentrations employed, and include buffers such as TRIS HCl, phosphate, citrate, acetate and other organic acid salts; antioxidants such as ascorbic acid; low molecular weight (less than about ten residues) peptides such as polyarginine, proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidinone; amino acids such as glycine, glutamic acid, aspartic acid, or arginine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including cellulose or its derivatives, glucose, mannose, or dextrins; chelating agents such as EDTA; sugar alcohols such as mannitol or sorbitol; counterions such as sodium and/or nonionic surfactants such as TWEEN, PLURONICS or polyethyleneglycol.

[0126] Sterile compositions for injection can be formulated according to conventional pharmaceutical practice as described in *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (20th ed, Lippincott Williams & Wilkens Publishers (2003)). For example, dissolution or suspension of the active compound in a vehicle such as water or naturally occurring vegetable oil like sesame, peanut, or cottonseed oil or a synthetic fatty vehicle like ethyl oleate or the like may be desired. Buffers, preservatives, antioxidants and the like can be incorporated according to accepted pharmaceutical practice.

[0127] Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the polypeptide, which matrices are in the form of shaped articles, films or microcapsules. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (e.g., poly(2-hydroxyethyl-methacrylate) as described by Langer *et al.*, *J. Biomed Mater. Res.*, (1981) 15:167-277 and Langer, *Chem. Tech.*, (1982) 12:98-105, or poly(vinylalcohol)), polylactides (U.S. Pat. No. 3,773,919, EP 58,481), copolymers of L-glutamic acid and gamma ethyl-L-glutamate (Sidman *et al.*, *Biopolymers*, (1983) 22:547-556), non-degradable ethylene-vinyl acetate (Langer *et al.*, *supra*), degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUPRON Depot™ (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid (EP 133,988).

[0128] While polymers such as ethylene-vinyl acetate and lactic acid-glycolic acid enable release of molecules for over 100 days, certain hydrogels release proteins for shorter time periods. When encapsulated proteins remain in the body for a long time, they may denature or aggregate as a result of exposure to moisture at 37°C, resulting in a loss of biological activity and possible changes in immunogenicity. Rational strategies

can be devised for protein stabilization depending on the mechanism involved. For example, if the aggregation mechanism is discovered to be intermolecular S-S bond formation through disulfide interchange, stabilization may be achieved by modifying sulfhydryl residues, lyophilizing from acidic solutions, controlling moisture content, using appropriate additives, and developing specific polymer matrix compositions.

[0129] Sustained-released compositions also include preparations of crystals of the antibody suspended in suitable formulations capable of maintaining crystals in suspension. These preparations when injected subcutaneously or intraperitonealy can produce a sustained release effect. Other compositions also include liposomally entrapped antibodies. Liposomes containing such antibodies are prepared by methods known per se: U.S. Pat. No. DE 3,218,121; Epstein *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1985) 82:3688-3692; Hwang *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1980) 77:4030-4034; EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; 142,641; Japanese patent application 83-118008; U.S. Pat. Nos. 4,485,045 and 4,544,545; and EP 102,324.

[0130] The dosage of the antibody formulation for a given patient will be determined by the attending physician taking into consideration various factors known to modify the action of drugs including severity and type of disease, body weight, sex, diet, time and route of administration, other medications and other relevant clinical factors. Therapeutically effective dosages may be determined by either *in vitro* or *in vivo* methods.

[0131] An effective amount of the antibodies, described herein, to be employed therapeutically will depend, for example, upon the therapeutic objectives, the route of administration, and the condition of the patient. Accordingly, it is preferred for the therapist to titer the dosage and modify the route of administration as required to obtain the optimal therapeutic effect. A typical daily dosage might range from about 0.001mg/kg to up to 100mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. Typically, the clinician will administer the therapeutic antibody until a dosage is reached that achieves the desired effect. The progress of this therapy is easily monitored by conventional assays or as described herein.

[0132] It will be appreciated that administration of therapeutic entities in accordance with the compositions and methods herein will be administered with suitable carriers, excipients, and other agents that are incorporated into formulations to provide improved transfer, delivery, tolerance, and the like. These formulations include, for example, powders, pastes, ointments, jellies, waxes, oils, lipids, lipid (cationic or anionic)

containing vesicles (such as Lipofectin™), DNA conjugates, anhydrous absorption pastes, oil-in-water and water-in-oil emulsions, emulsions carbowax (polyethylene glycols of various molecular weights), semi-solid gels, and semi-solid mixtures containing carbowax. Any of the foregoing mixtures may be appropriate in treatments and therapies in accordance with the present invention, provided that the active ingredient in the formulation is not inactivated by the formulation and the formulation is physiologically compatible and tolerable with the route of administration. *See also* Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." *Int. J. Pharm.* 203(1-2):1-60 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts." *J Pharm Sci* .89(8):967-78 (2000), Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" *PDA J Pharm Sci Technol.* 52:238-311 (1998) and the citations therein for additional information related to formulations, excipients and carriers well known to pharmaceutical chemists.

Design and Generation of Other Therapeutics

[0133] In accordance with the present invention and based on the activity of the antibodies that are produced and characterized herein with respect to IGF-I/II, the design of other therapeutic modalities is facilitated and disclosed to one of skill in the art. Such modalities include, without limitation, advanced antibody therapeutics, such as bispecific antibodies, immunotoxins, radiolabeled therapeutics, and single antibody V domains, antibody-like binding agent based on other than V region scaffolds, generation of peptide therapeutics, gene therapies, particularly intrabodies, antisense therapeutics, and small molecules.

[0134] In connection with the generation of advanced antibody therapeutics, where complement fixation is a desirable attribute, it can be possible to sidestep the dependence on complement for cell killing through the use of bispecifics, immunotoxins, or radiolabels, for example.

[0135] For example, bispecific antibodies can be generated that comprise (i) two antibodies, one with a specificity to IGF-I/II and another to a second molecule, that are conjugated together, (ii) a single antibody that has one chain specific to IGF-I/II and a second chain specific to a second molecule, or (iii) a single chain antibody that has specificity to both IGF-I/II and the other molecule. Such bispecific antibodies can be

generated using techniques that are well known; for example, in connection with (i) and (ii) *see e.g.,* Fanger et al. *Immunol Methods* 4:72-81 (1994) and Wright and Harris, *supra.* and in connection with (iii) *see e.g.,* Traunecker et al. *Int. J. Cancer (Suppl.)* 7:51-52 (1992). In each case, the second specificity can be made as desired. For example, the second specificity can be made to the heavy chain activation receptors, including, without limitation, CD16 or CD64 (*see e.g.,* Deo et al. 18:127 (1997)) or CD89 (*see e.g.,* Valerius et al. *Blood* 90:4485-4492 (1997)).

[0136] Antibodies can also be modified to act as immunotoxins utilizing techniques that are well known in the art. *See e.g.,* Vitetta *Immunol Today* 14:252 (1993). *See also* U.S. Patent No. 5,194,594. In connection with the preparation of radiolabeled antibodies, such modified antibodies can also be readily prepared utilizing techniques that are well known in the art. *See e.g.,* Junghans et al. in *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2d edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996)). *See also* U.S. Patent Nos. 4,681,581, 4,735,210, 5,101,827, 5,102,990 (RE 35,500), 5,648,471, and 5,697,902. Each of immunotoxins and radiolabeled molecules would be likely to kill cells expressing the desired multimeric enzyme subunit oligomerization domain. In some embodiments, a pharmaceutical composition comprising an effective amount of the antibody in association with a pharmaceutically acceptable carrier or diluent is provided.

[0137] In some embodiments, an anti-IGF-I/II antibody is linked to an agent (*e.g.,* radioisotope, pharmaceutical composition, or a toxin). Preferably, such antibodies can be used for the treatment of diseases, such diseases can relate to cells expressing IGF-I/II or cells overexpressing IGF-I/II. For example, it is contemplated that the drug possesses the pharmaceutical property selected from the group of antimitotic, alkylating, antimetabolite, antiangiogenic, apoptotic, alkaloid, COX-2, and antibiotic agents and combinations thereof. The drug can be selected from the group of nitrogen mustards, ethylenimine derivatives, alkyl sulfonates, nitrosoureas, triazenes, folic acid analogs, anthracyclines, taxanes, COX-2 inhibitors, pyrimidine analogs, purine analogs, antimetabolites, antibiotics, enzymes, epipodophyllotoxins, platinum coordination complexes, vinca alkaloids, substituted ureas, methyl hydrazine derivatives, adrenocortical suppressants, antagonists, endostatin, taxols, camptothecins, oxaliplatin, doxorubicins and their analogs, and a combination thereof.

[0138] Examples of toxins further include gelonin, Pseudomonas exotoxin (PE), PE40, PE38, diphtheria toxin, ricin, ricin, abrin, alpha toxin, saporin, ribonuclease

(RNase), DNase I, Staphylococcal enterotoxin-A, pokeweed antiviral protein, gelonin, Pseudomonas endotoxin, as well as derivatives, combinations and modifications thereof.

[0139] Examples of radioisotopes include gamma-emitters, positron-emitters, and x-ray emitters that can be used for localization and/or therapy, and beta-emitters and alpha-emitters that can be used for therapy. The radioisotopes described previously as useful for diagnostics, prognostics and staging are also useful for therapeutics. Non-limiting examples of anti-cancer or anti-leukemia agents include anthracyclines such as doxorubicin (adriamycin), daunorubicin (daunomycin), idarubicin, detorubicin, carminomycin, epirubicin, esorubicin, and morpholino and substituted derivatives, combinations and modifications thereof. Exemplary pharmaceutical agents include cis-platinum, taxol, calicheamicin, vincristine, cytarabine (Ara-C), cyclophosphamide, prednisone, daunorubicin, idarubicin, fludarabine, chlorambucil, interferon alpha, hydroxyurea, temozolomide, thalidomide, and bleomycin, and derivatives, combinations and modifications thereof. Preferably, the anti-cancer or anti-leukemia is doxorubicin, morpholinodoxorubicin, or morpholinodaunorubicin.

[0140] As will be appreciated by one of skill in the art, in the above embodiments, while affinity values can be important, other factors can be as important or more so, depending upon the particular function of the antibody. For example, for an immunotoxin (toxin associated with an antibody), the act of binding of the antibody to the target can be useful; however, in some embodiments, it is the internalization of the toxin into the cell that is the desired end result. As such, antibodies with a high percent internalization can be desirable in these situations. Thus, in one embodiment, antibodies with a high efficiency in internalization are contemplated. A high efficiency of internalization can be measured as a percent internalized antibody, and can be from a low value to 100%. For example, in varying embodiments, 0.1-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-45, 45-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-99, and 99-100% can be a high efficiency. As will be appreciated by one of skill in the art, the desirable efficiency can be different in different embodiments, depending upon, for example, the associated agent, the amount of antibody that can be administered to an area, the side effects of the antibody-agent complex, the type (*e.g.*, cancer type) and severity of the problem to be treated.

[0141] In other embodiments, the antibodies disclosed herein provide an assay kit for the detection of IGF-I/II expression in mammalian tissues or cells in order to screen for a disease or disorder associated with changes in expression of IGF-I/II. The kit

comprises an antibody that binds IGF-I/II and means for indicating the reaction of the antibody with the antigen, if present.

[0142] In some embodiments, an article of manufacture is provided comprising a container, comprising a composition containing an anti-IGF-I/II antibody, and a package insert or label indicating that the composition can be used to treat disease mediated by IGF-I/II expression. Preferably a mammal, and more preferably, a human, receives the anti-IGF-I/II antibody.

Combinations

[0143] The anti-IGF-I/II antibodies defined hereinbefore may be applied as a sole therapy or may involve, in addition to the compound of the invention, conventional surgery or radiotherapy or chemotherapy. Such chemotherapy may include one or more of the following categories of anti-tumour agents :-

(i) antiproliferative/antineoplastic drugs and combinations thereof, as used in medical oncology, such as alkylating agents (for example cis-platin, carboplatin, cyclophosphamide, nitrogen mustard, melphalan, chlorambucil, busulphan and nitrosoureas); antimetabolites (for example antifolates such as fluoropyrimidines like 5-fluorouracil and tegafur, raltitrexed, methotrexate, cytosine arabinoside and hydroxyurea; antitumour antibiotics (for example anthracyclines like adriamycin, bleomycin, doxorubicin, daunomycin, epirubicin, idarubicin, mitomycin-C, dactinomycin and mithramycin); antimitotic agents (for example vinca alkaloids like vincristine, vinblastine, vindesine and vinorelbine and taxoids like taxol and taxotere); and topoisomerase inhibitors (for example epipodophyllotoxins like etoposide and teniposide, amsacrine, topotecan and camptothecin);

(ii) cytostatic agents such as antioestrogens (for example tamoxifen, toremifene, raloxifene, droloxifene and iodoxyfene), oestrogen receptor down regulators (for example fulvestrant), antiandrogens (for example bicalutamide, flutamide, nilutamide and cyproterone acetate), LHRH antagonists or LHRH agonists (for example goserelin, leuprorelin and buserelin), progestogens (for example megestrol acetate), aromatase inhibitors (for example as anastrozole, letrozole, vorazole and exemestane) and inhibitors of 5α-reductase such as finasteride;

(iii) agents which inhibit cancer cell invasion (for example metalloproteinase inhibitors like marimastat and inhibitors of urokinase plasminogen activator receptor function);

(iv) inhibitors of growth factor function, for example such inhibitors include growth factor antibodies, growth factor receptor antibodies (for example the anti-erbb2 antibody trastuzumab [Herceptin™] and the anti-erbb1 antibody cetuximab [C225]) , farnesyl transferase inhibitors, MEK inhibitors, tyrosine kinase inhibitors and serine/threonine kinase inhibitors, for example inhibitors of the epidermal growth factor family (for example EGFR family tyrosine kinase inhibitors such as *N*-(3-chloro-4-fluorophenyl)-7-methoxy-6-(3-morpholinopropoxy)quinazolin-4-amine (gefitinib, AZD1839), *N*-(3-ethynylphenyl)-6,7-bis(2-methoxyethoxy)quinazolin-4-amine (erlotinib, OSI-774) and 6-acrylamido-*N*-(3-chloro-4-fluorophenyl)-7-(3-morpholinopropoxy)quinazolin-4-amine (CI 1033)), for example inhibitors of the platelet-derived growth factor family and for example inhibitors of the hepatocyte growth factor family;

(v) antiangiogenic agents such as those which inhibit the effects of vascular endothelial growth factor, (for example the anti-vascular endothelial cell growth factor antibody bevacizumab [Avastin™], compounds such as those disclosed in International Patent Applications WO 97/22596, WO 97/30035, WO 97/32856 and WO 98/13354) and compounds that work by other mechanisms (for example linomide, inhibitors of integrin $\alpha v\beta 3$ function, angiostatin and inhibitors of the action of angiopoietins e.g angiopoietin 1 and angiopoietin 2);

(vi) vascular damaging agents such as Combretastatin A4 and compounds disclosed in International Patent Applications WO 99/02166, WO00/40529, WO 00/41669, WO01/92224, WO02/04434 and WO02/08213;

(vii) antisense therapies, for example those which are directed to the targets listed above, such as ISIS 2503, an anti-ras antisense;

(viii) gene therapy approaches, including for example approaches to replace aberrant genes such as aberrant p53 or aberrant BRCA1 or BRCA2, GDEPT (gene-directed enzyme pro-drug therapy) approaches such as those using cytosine deaminase, thymidine kinase or a bacterial nitroreductase enzyme and approaches to increase patient tolerance to chemotherapy or radiotherapy such as multi-drug resistance gene therapy;

(ix) immunotherapy approaches, including for example ex-vivo and in-vivo approaches to increase the immunogenicity of patient tumour cells, such as transfection with cytokines such as interleukin 2, interleukin 4 or granulocyte-macrophage colony stimulating factor, approaches to decrease T-cell anergy, approaches using transfected immune cells such as cytokine-transfected dendritic cells, approaches using cytokine-transfected tumour cell lines and approaches using anti-idiotypic antibodies;

(x) cell cycle inhibitors including for example CDK inhibitiors (eg flavopiridol) and other inhibitors of cell cycle checkpoints (eg checkpoint kinase); inhibitors of aurora kinase and other kinases involved in mitosis and cytokinesis regulation (eg mitotic kinesins); and histone deacetylase inhibitors;

(xi) endothelin antagonists, including endothelin A antagonists, endothelin B antagonists and endothelin A and B antagonists; for example ZD4054 and ZD1611 (WO 96 40681), atrasentan and YM598; and

(xii) biotherapeutic therapeutic approaches for example those which use peptides or proteins (such as antibodies or soluble external receptor domain constructions) which either sequest receptor ligands, block ligand binding to receptor or decrease receptor signalling (e.g. due to enhanced receptor degradation or lowered expression levels)

[0144] Such conjoint treatment may be achieved by way of the simultaneous, sequential or separate dosing of the individual components of the treatment. Such combination products employ the compounds of this invention within the dosage range described hereinbefore and the other pharmaceutically-active agent within its approved dosage range.

EXAMPLES

[0145] The following examples, including the experiments conducted and results achieved are provided for illustrative purposes only and are not to be construed as limiting upon the teachings herein.

EXAMPLE 1

Immunization and TITERING

Immunization

[0146] Recombinant human IGF-I and IGF-II obtained from R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN Cat. No. 291-G1 and 292-G2 respectively) were used as antigens. Monoclonal antibodies against IGF-I/II were developed by sequentially immunizing XenoMouse® mice (XenoMouse strains XMG2 and XMG4 (3C-1 strain), Abgenix, Inc. Fremont, CA). XenoMouse animals were immunized via footpad route for all injections. The total volume of each injection was 50 µl per mouse, 25 µl per footpad. A total of ten (10) mice were immunized in each group. Each injection was with 10 µg per mouse of IGF-I or IGF-II alone or conjugated to Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) antigen as a carrier, as detailed in Table 2. The first injection was made up in Dulbecco's PBS (DPBS) and admixed 1:1 v/v with Titermax Gold Adjuvant (SIGMA Cat. #T2684, lot #K1599). A total of 8 to 11 additional boosts were then administered over a period of 27 to 38 days, admixed with 25 µg of Adju-Phos (aluminum phosphate gel, Catalog # 1452-250, batch #8937, HCl Biosector) and 10 µg CpG (15 µl of ImmunEasy Mouse Adjuvant, catalog # 303101; lot #11553042; Qiagen) per mouse, followed by a final boost of 10 µg of antigen in pyrogen-free DPBS, without adjuvant. For combined immunization (animals immunized with both IGF-I and IGF-II), the second antigen was given in the last two (2) boosts.

TABLE 2. IMMUNIZATION SUMMARY

Immunization Group	Initial Immunogen	Final Immunogen	KLH Conjugated	Isotype of Mice	Fusion Group
1	IGF-1	IGF-1	–	IgG2-κλ	1
3	IGF-1	IGF-1	–	IgG4-κλ	1
5	IGF-1	IGF-1	+	IgG2-κλ	1
7	IGF-1	IGF-1	+	IgG4-κλ	1
2	IGF-2	IGF-2	–	IgG2-κλ	2
4	IGF-2	IGF-2	–	IgG4-κλ	2
6	IGF-2	IGF-2	+	IgG2-κλ	2
8	IGF-2	IGF-2	+	IgG4-κλ	2
9	IGF-1	IGF-2	–	IgG2-κλ	3
11	IGF-1	IGF-2	–	IgG4-κλ	3
13	IGF-1	IGF-2	+	IgG2-κλ	3
15	IGF-1	IGF-2	+	IgG4-κλ	3
10	IGF-2	IGF-1	–	IgG2-κλ	4
12	IGF-2	IGF-1	–	IgG4-κλ	4

14	IGF-2	IGF-1	+	IgG2-κλ	4
16	IGF-2	IGF-1	+	IgG4-κλ	4

EXAMPLE 2

RECOVERY OF LYMPHOCYTES, B-CELL ISOLATIONS, FUSIONS AND GENERATION OF HYBRIDOMAS

[0147] Immunized mice were sacrificed by cervical dislocation, and the draining lymph nodes harvested and pooled from each cohort. The lymphoid cells were dissociated by grinding in DMEM to release the cells from the tissues and the cells were suspended in DMEM. The cells were counted, and 0.9 ml DMEM per 100 million lymphocytes added to the cell pellet to resuspend the cells gently but completely. Using 100 μl of CD90+ magnetic beads per 100 million cells, the cells were labeled by incubating the cells with the magnetic beads at 4°C for 15 minutes. The magnetically labeled cell suspension containing up to 10^8 positive cells (or up to $2x10^9$ total cells) was loaded onto a LS+ column and the column washed with DMEM. The total effluent was collected as the CD90-negative fraction (most of these cells were expected to be B cells).

[0148] The fusion was performed by mixing washed enriched B cells from above and nonsecretory myeloma P3X63Ag8.653 cells purchased from ATCC, cat.# CRL 1580 (Kearney et al, J. Immunol. 123, 1979, 1548-1550) at a ratio of 1:1. The cell mixture was gently pelleted by centrifugation at 800 x g. After complete removal of the supernatant, the cells were treated with 2-4 mL of Pronase solution (CalBiochem, cat. # 53702; 0.5 mg/ml in PBS) for no more than 2 minutes. Then 3–5 ml of FBS was added to stop the enzyme activity and the suspension was adjusted to 40 ml total volume using electro cell fusion solution, (ECFS, 0.3M Sucrose, Sigma, Cat# S7903, 0.1mM Magnesium Acetate, Sigma, Cat# M2545, 0.1mM Calcium Acetate, Sigma, Cat# C4705). The supernatant was removed after centrifugation and the cells were resuspended in 40 ml ECFS. This wash step was repeated and the cells again were resuspended in ECFS to a concentration of $2x10^6$ cells/ml.

[0149] Electro-cell fusion was performed using a fusion generator (model ECM2001, Genetronic, Inc., San Diego, CA). The fusion chamber size used was 2.0 ml, using the following instrument settings:

[0150] Alignment condition: voltage: 50 V, time: 50 sec.

[0151] Membrane breaking at: voltage: 3000 V, time: 30 μsec

[0152] Post-fusion holding time: 3 sec

[0153] After ECF, the cell suspensions were carefully removed from the fusion chamber under sterile conditions and transferred into a sterile tube containing the same volume of Hybridoma Culture Medium (DMEM, JRH Biosciences), 15 % FBS (Hyclone), supplemented with L-glutamine, pen/strep, OPI (oxaloacetate, pyruvate, bovine insulin) (all from Sigma) and IL-6 (Boehringer Mannheim). The cells were incubated for 15-30 minutes at 37°C, and then centrifuged at 400 x g (1000 rpm) for five minutes. The cells were gently resuspended in a small volume of Hybridoma Selection Medium (Hybridoma Culture Medium supplemented with 0.5x HA (Sigma, cat. # A9666)), and the volume adjusted appropriately with more Hybridoma Selection Medium, based on a final plating of $5x10^6$ B cells total per 96-well plate and 200 µl per well. The cells were mixed gently and pipetted into 96-well plates and allowed to grow. On day 7 or 10, one-half the medium was removed, and the cells re-fed with Hybridoma Selection Medium.

EXAMPLE 3

SELECTION OF CANDIDATE ANTIBODIES BY ELISA

[0154] After 14 days of culture, hybridoma supernatants were screened for IGF-I/II-specific monoclonal antibodies. The ELISA plates (Fisher, Cat. No. 12-565-136) were coated with 50 µl/well of human IGF-I or IGF-II (2 µg/ml) in Coating Buffer (0.1 M Carbonate Buffer, pH 9.6, $NaHCO_3$ 8.4 g/L), then incubated at 4°C overnight. After incubation, the plates were washed with Washing Buffer (0.05% Tween 20 in PBS) 3 times. 200 µl/well Blocking Buffer (0.5% BSA, 0.1% Tween 20, 0.01% Thimerosal in 1x PBS) were added and the plates incubated at room temperature for 1 hour. After incubation, the plates were washed with Washing Buffer three times. 50 µl/well of hybridoma supernatants, and positive and negative controls were added and the plates incubated at room temperature for 2 hours.

[0155] After incubation, the plates were washed three times with Washing Buffer. 100 µl/well of detection antibody goat anti-huIgGFc-HRP (Caltag, Cat. No. H10507), was added and the plates incubated at room temperature for 1 hour. In a secondary screen, the positives in first screening were screened in two sets, one for human IgG (heavy chain) detection and the other for human Ig kappa light chain detection (goat anti-hIg kappa-HRP (Southern Biotechnology, Cat. No. 2060-05) in order to demonstrate fully human composition for both IgG and Ig kappa. After incubation, the

plates were washed three times with Washing Buffer. 100 µl/well of TMB (BioFX Lab. Cat. No. TMSK-0100-01) were added and the plates allowed to develop for about 10 minutes (until negative control wells barely started to show color). 50 µl/well stop solution (TMB Stop Solution, (BioFX Lab. Cat. No. STPR-0100-01) was then added and the plates read on an ELISA plate reader at 450nm. As indicated in Table 3, there were a total of 1,233 wells containing antibodies against IGF-I and -II.

[0156] All antibodies that bound in the ELISA assay were counter screened for binding to insulin by ELISA in order to exclude those that cross-reacted with insulin. The ELISA plates (Fisher, Cat. No. 12-565-136) were coated with 50 µl/well of recombinant insulin (concentration: 1µg/ml; Sigma, catalog # I2643) in Coating Buffer (0.1 M Carbonate Buffer, pH 9.6, $NaHCO_3$ 8.4 g/L), then incubated at 4°C overnight. As detailed in Table 3, a total of 1,122 antibodies from the original 1233 antibodies did cross react with insulin.

TABLE 3. SCREENING SUMMARY

			Confirmation Screen			
Fn #	**Mouse strain**	**Immunogen**	**Target with hG detection**	**Target with hK+hL detection**	**IGF-I(+) & IGF-II(+)**	**IGF-I(+) & IGF-II(+) and hu-Insulin (-)**
1	G2 KL	IGF-I-KLH	IGF-II	IGF-I	36	28
2	G4 KL	IGF-I-KLH	IGF-II	IGF-I	65	55
3	G2 KL	IGF-II or IGF-II-KLH	IGF-I	IGF-II	168	150
4	G4 KL	IGF-II or IGF-II-KLH	IGF-I	IGF-II	197	194
5	G2 KL	IGF-I/-II-KLH	IGF-II	IGF-II	54	50
6	G4 KL	IGF-I/-II-KLH	IGF-II	IGF-II	101	86
7	G2 KL	IGF-II/-I-KLH	IGF-II	IGF-II	294	271
8	G4 KL	IGF-II/-I or IGF-II/-I-KLH	IGF-II	IGF-II	318	288
		Total F1 to F4			466	427
		Total F5 to F8			767	695
		Total			**1,233**	**1,122**

[0157] Finally, the antibodies that were selected in the counter-screen were then tested by ELISA to confirm binding to mouse IGF-I and IGF-II proteins. A total of 683 hybridoma lines were identified that have cross-reactivity with mouse IGF-I/II. Accordingly, these hybridoma lines expressed antibodies that bound to human IGF-I, human IGF-II, mouse IGF-I and mouse IGF-II, but did not bind to human insulin.

EXAMPLE 4

INHIBITION OF IGF-I AND IGF-II BINDING TO IGF-IR

[0158] The purpose of this study was to screen the 683 anti-IGF-I/II human IgG2 and IgG4 antibodies at the hybridoma supernatant stage for neutralizing activity, as determined by inhibition of IGF-I and IGF-II binding to the IGF-IR receptor. Thus, a receptor/ligand binding assay was performed with NIH3T3 cells that overexpress the human IGF-IR receptor, as described below.

[0159] Briefly, multi-screen filter plates (MultiScreen 0.65 μM 96-well PVDF, Millipore, Cat. No. MADV N0B 10) were blocked with blocking buffer (PBS containing 10%BSA with 0.02%NaN_3) at 200μL/well overnight at 4°C. [^{125}I]-labeled IGF (Amersham Life Sciences Cat No. IM172 (IGF-I) or IM238 (IGF-II)) at 100μCi/ml and 50nM was diluted to the appropriate concentration (70pM final for IGF-I and 200pM final for IGF-II) in binding buffer (PBS containing 2%BSA with 0.02% NaN_3). The blocking buffer-coated filter plate was washed once with 200μL PBS, and 50μL anti-IGF-I/II Ab supernatants (diluted in binding buffer to 25% final volume) were preincubated with 25μL of [^{125}I]-IGF in the MultiScreen plate for 30-60 minutes on ice. Subconfluent NIH3T3 mouse fibroblasts stably expressing hIGF-IR (obtained from AstraZeneca) were harvested with trypsin and resuspended in cold binding buffer at $6x10^6$/ml, and 25μL of cells were added to the plate for a two-hour incubation on ice. The plate was washed four times with 200μL cold PBS and dried overnight. Twenty-five μL/well of scintillant (SuperMix cocktail, Wallac/Perkin Elmer Cat No. 1200-439) was added and the plates were read using a Microbeta Trilux reader (Wallac).

[0160] The following controls were used per screening plate: no antibody (total IGF bound), control neutralizing anti-IGF-I (#05-172, Upstate) or anti-IGF-II (#MAB292, R&D Systems) mAbs at 50μg/ml (non-specific background) and 0.075 to 0.5μg/ml (approximate EC50 values of the neutralizing antibodies), and isotype-matched control human IgG2 (PK16.3.1, Abgenix, lot #360-154) or IgG4 (108.2.1, Abgenix,

lot#718-53A) mAbs at a concentration of 0.5μg/ml (approximate EC50 value of neutralizing antibodies). An additional titration of control neutralizing antibodies and isotype-matched control human antibodies was added to one plate per screening assay (1/10 serial dilution from 50ug/ml (333.3nM)). All controls with or without antibodies were prepared in binding buffer supplemented with anti-KLH human IgG2 or IgG4 exhaust supernatant at 25% final volume.

[0161] The percentage of inhibition was determined as follows:

% Inhibition= ([(Mean CPM Total ^{125}I-IGF bound)- (Mean CPM ^{125}I-IGF bound in the presence of antibody)] / [(Mean CPM Total ^{125}I-IGF bound)-(Mean CPM ^{125}I-IGF bound in the presence of an excess of control neutralizing antibody*)]) x100

[0162] * the non-specific background was determined as CPM of cells with an excess of control neutralizing anti-IGF Ab (50ug/ml, 333.3nM), which was found to be equivalent to an excess of cold IGF (less than or equal to 10% of total CPM)

[0163] The anti-IGF-I/II supernatant screening was split by isotype because of radiolabeled ligand availability issues. As shown in Table 4, supernatants from the anti-IGF-I/II antibodies with an IgG2 isotype (293 total) were first screened against radiolabeled IGF-I. A cut-off at 40% inhibition was initially applied to this screening (i.e. hybridoma lines inhibiting at 40% and above were selected), and 111 hits were selected for subsequent screening against IGF-II. Of the 111 hits, a total of 91 lines were found to inhibit IGF-II binding to its receptor with a 50% cut-off. A total of 71 final hits were selected by taking supernatants that neutralized 50% of both IGF-I and IGF-II activity.

[0164] All the supernatants expressing IgG4 isotypes (390 total) were initially screened against radiolabeled IGF-II, and 232 hits with a cut-off at 50% inhibition were subsequently screened against IGF-I. A total of 90 lines were able to inhibit IGF-I binding to its receptor with a 50% cut-off. After combining the hits for IgG2 (71) and IgG4 (90), a total of 161 lines were obtained which inhibited IGF-I and IGF-II by 50% or more.

[0165] In conclusion, from the 683 original supernatants, 343 (111 IgG2 and 232 IgG4, 50.2%) were selected from the first screening with either IGF-I or IGF-II. A total of 161 final hits were obtained (23.6% of original lines), which are able to block

both IGF-I and IGF-II binding to IGF-IR with an overall cut-off criteria of 50% inhibition.

TABLE 4. ANTI-IGF-I/II EXHAUST SUPERNATANT SCREENING SUMMARY (50% CUT-OFF)

Fusion #	Mouse strain	Immunogen	ESN Activity hIGF-II with hG^+/hK^+ or hG^+/hL^+	R/L Binding Assay IGF-I	IGF-I+ % Total	R/L Binding Assay IGF-II on IGF-I+	IGF-I/II+ % Total	R/L Binding Assay IGF-II	IGF-II+ % Total	R/L Binding Assay IGF-I on IGF-II+	IGF-I/II+ % Total
1	G2 KL	IGF-I-KLH	14	12	85.7	1	7.1				
2	G4 KL	IGF-I-KLH	20					4	20.0	4	20.0
3	G2 KL	IGF-II or IGF-II-KLH	49	13	26.5	4	8.2				
4	G4 KL	IGF-II or IGF-II-KLH	114					86	75.4	36	31.6
5	G2 KL	IGF-I/-II-KLH	32	11	34.4	7	21.9				
6	G4 KL	IGF-I/-II-KLH	47					21	44.7	8	17.0
7	G2 KL	IGF-II/-I-KLH	198	75	37.9	59	29.8				
8	G4 KL	IGF-II/-I or IGF-II/-I-KLH	209					121	57.9	42	20.1
			683	111	16.3	71	10.4	232	34.0	90	13.2
				Cut-off 40%	IgG2				IgG4		

EXAMPLE 5

HIGH ANTIGEN AND LIMITED ANTIGEN ELISAS

[0166] In order to determine the relative affinities among the 161 hybridoma lines selected in Example 4, as well as the concentration of antibody in the supernatants of each line, high antigen (HA) and limited antigen (LA) ELISA assays were carried out. In the HA quantitation assay, the high antigen concentration and overnight incubation limit the effect of antibody affinity, allowing for quantitation of the relative amount of antigen-specific antibody present in each sample. The low antigen concentration in the LA assay limits the effect of antibody concentration and results in a ranking of antibodies based on their relative affinity.

High Antigen Quantitation Assay

[0167] ELISA plates were coated with relatively large amounts of either IGF-I or IGF-II antigen (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN Cat. No. 291-G1 and 292-G2 respectively) at 500ng/ml (67nM). Antibody-containing hybridoma supernatants were titrated over a dilution range of 1:50 to 1:12200. A control of a known IGF-specific antibody (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN Cat. No. MAB291 and MAB292 respectively) was used to define the linear range of the assay. Data within the linear range were then used to derive the relative concentration of the IGF-specific antibody in each titrated sample.

Limited Antigen Assay

[0168] Microtiter plates were coated with low concentrations of antigen. Fifty microliters (50 µL) of IGF-I or IGF-II at 64, 32, 16, 8, 4, and 2 ng/ml (covering a range of 8.5 nM to 0.26 nM) in 1% skim milk / 1X PBS pH 7.4 / 0.5% azide was added to each well. The plate was incubated for 30 minutes.

[0169] Plates were washed four times (4X) with water, and 50µL of hybridoma supernatant containing test antibodies diluted 1:25 in 1% skim milk / 1X PBS pH 7.4 / 0.5% azide were added to the wells. Plates were wrapped tightly with plastic wrap or paraffin film, and incubated overnight with shaking at room temperature.

[0170] On the following day, all plates were washed five times (5X) and 50 µL goat anti-Human IgG Fc HRP polyclonal antibody at a concentration of 0.5 ug/ml in 1%

milk, 1X PBS pH 7.4 was added to each well. The plates were incubated for 1 hour at room temperature.

[0171] Plates were washed at least five times (5X with tap water). Fifty microliters (50) µL of HPR substrate TMB was added to each well, and the plate were incubated for 30 minutes. The HRP-TMB reaction was stopped by adding 50 µL of 1M phosphoric acid to each well. Optical density (absorbance) at 450 nm was measured for each well of the plate.

Data Analysis

[0172] OD values of test antibodies were averaged and the range was calculated. Antibodies with the highest signal and acceptably low standard deviation were selected as antibodies having a higher affinity for the antigen than did a reference antibody.

[0173] An analysis was then made to select top antibodies based on either neutralization (Example 4), potency (low antibody concentration as determined by HA ELISA and high inhibition of ligand binding), affinity (LA ELISA), or all three criteria. From this analysis, a list of 25 antibodies was generated. A separate analysis based on average % inhibition of IGF-I and -II binding and affinity for both IGF-I and IGF-II generated a second list of 25 antibodies. Sixteen antibodies were common to both lists, resulting in a final list of 40 antibodies. The LA and HA results for these 40 antibodies are summarized in Table 5. These 40 lines were selected for cloning, of which 33 were successfully cloned.

TABLE 5. RESULTS OF HIGH AND LIMITED ANTIGEN ELISA FOR TOP 40 ANTIBODIES

	IGF1 HA		IGF2 HA		IGF1 LA	IGF2 LA	IGF1 LA	IGF2 LA
Line ID	Avg (ug/ml) HA1	Std. Dev HA1	Avg (ug/ml) HA2	Std. Dev HA2	IGF1 2ng/ml	IGF2 2ng/ml	IGF1 4ng/ml	IGF2 4ng/ml
4.121	1.16	0.16	3.56	1.34	0.56	0.53	1.14	0.90
4.141	1.99	0.22	1.99	0.21	0.57	0.79	1.25	1.52
4.142	4.70	0.21	3.65	0.31	0.78	1.00	1.76	1.78
4.143	1.74	0.17	2.03	0.41	0.60	0.99	1.20	1.91
4.25	1.26	0.23	1.48	0.36	0.71	0.81	1.31	1.54

	IGF1 HA		IGF2 HA		IGF1 LA	IGF2 LA	IGF1 LA	IGF2 LA
Line ID	Avg (ug/ml) HA1	Std. Dev HA1	Avg (ug/ml) HA2	Std. Dev HA2	IGF1 2ng/ml	IGF2 2ng/ml	IGF1 4ng/ml	IGF2 4ng/ml
4.69	7.17	1.16	6.50	0.53	0.80	0.80	1.50	1.54
4.90	1.15	0.12	3.68	0.77	0.58	0.48	1.04	0.89
7.118	10.34	1.26	10.32	1.90	0.81	0.85	1.56	1.44
7.123	13.4	3.2	12.0	2.8	1.0	1.7	1.66	2.58
7.127	7.28	0.44	6.59	1.55	1.19	1.37	2.29	2.40
7.130	4.32	0.32	3.51	1.34	0.64	1.17	1.36	1.98
7.146	12.04	0.98	9.63	0.6	0.2	0.86	0.29	1.58
7.158	9.29	0.49	7.1	0.56	1.71	1.42	3.00	2.46
7.159	16.53	1.83	41.1		0.56	1.65	0.98	2.47
7.160	4.9	0.5	5.1	0.2	1.7	2.2	3.14	3.30
7.175	8.46	0.49	6.21	1.22	0.13	0.34	0.14	0.62
7.202	11.94	1.98	15.24	1.72	1.11	1.68	2.28	2.69
7.212	11.30	1.90	10.86	1.26	0.97	0.93	2.22	1.54
7.215	10.11	2.05	10.94	1.39	1.01	1.09	2.25	1.93
7.23	4.30	0.26	3.99	0.29	0.55	1.22	1.40	2.17
7.234	4.7	1.4	3.1	0.4	0.7	1.4	1.79	2.44
7.251	3	0.41	1.93	0.17	1.09	1.02	1.31	1.53
7.252	8.25	0.51	5.55	1.68	1.22	1.23	2.53	2.09
7.268	7.58	0.42	5.07	0.92	1.47	1.37	3.06	2.42
7.29	12.5	1.24	23.53	4.7	0.18	0.39	0.27	0.49
7.3	13.18	2.12	8.83	0.58	0.81	1.28	2.07	1.96
7.34	12.54	1.99	14.67	3.05	0.21	1.07	0.44	1.84
7.41	3.69	0.19	4.97	0.8	1.02	1.53	2.21	2.32
7.56	14.6	2.0	21.7	3.7	1.3	1.4	2.38	2.46
7.58	17.52	0.01	27.54	6.22	0.21	1.15	0.47	1.82
7.66	6.02	0.81	6.18	0.71	0.49	0.97	1.42	1.53
7.77	8.42	0.18	7.25	1.12	0.64	0.46	1.50	1.00
7.85	22.67	0.68	23.63	0.93	0.1	0.33	0.16	0.51
7.99	7.9	0.2	5.9	1.6	0.9	1.0	1.87	1.65
8.119	1.26	0.00	0.77	0.16	2.37	0.79	3.77	1.36
8.141	5.96	0.50	4.12	0.61	1.80	0.61	3.02	1.08
8.146	4.03	0.45	2.55	0.74	0.97	1.06	2.13	1.98
8.287	4.8	0.1	2.8	0.8	2.2	1.6	3.80	2.91
8.8	2.00	0.17	1.45	0.25	1.72	0.77	3.13	1.46
8.86	3.15	0.19	2.36	0.24	0.92	1.35	1.76	2.18

EXAMPLE 6

BINDING OF ANTIBODIES TO IGF-I AND IGF-II BOUND TO IGFBP-3

[0174] IGF-I and –II circulate in serum mostly bound to IGF-binding proteins (IGFBPs). One aim was to identify antibodies that do not recognize IGFs in complex with IGFBPs, in order to avoid *in vivo* depletion of anti-IGF antibodies. The following assay format was developed for the characterization of antibodies that recognize IGF-I or IGF-II when these growth factors are complexed with IGFBP-3. Specifically, this assay tested the ability of IGF in IGF/anti-IGF antibody complexes to bind IGFBP-3.

Antibody-Mediated Block of Capture of IGF by IGFBP-3

[0175] An assay was developed wherein complexes were pre-formed between IGF-I or IGF-II and IGF-specific antibodies from the aforementioned examples. The ability of these complexes to bind to IGFBP-3 was tested using AlphaScreen assay technology (PerkinElmer). In a 384-well plate, 10 µL 1:20 diluted hybridoma supernatants were mixed with 10 µL of 3 nM biotinylated IGF-I or IGF-II and incubated at room temperature for 2 hours. Streptavidin-coated AlphaScreen donor beads and IGFBP-3-coupled AlphaScreen acceptor beads (10 uL of a mixture, for a 1/60 final dilution of the hybridoma supernatants) were added, and the incubation was continued for another hour. Samples were then read in a Packard Fusion plate reader.

[0176] Three commercially available anti-IGF monoclonal antibodies M23 (Cell Sciences), 05-172 (Upstate) and MAB291 (R&D Systems) showed different abilities to inhibit IGF binding to IGFBP with IC50 values ranging from low ng/mL to 100 ng/mL. No inhibition of IGF-I binding to the IGFBP-3 was observed with irrelevant mouse IgG and human IgG up to 10 µg/mL, suggesting that the anti-IGF-I effect is specific. Commercially available monoclonal antibodies 05-166 (Upstate) and MAB292 (R&D) showed a significant difference in affinity for inhibition of IGF-II / IGFBP-3 interactions. These experiments show that anti-IGF mAbs can block the binding of IGF to IGFBP-3, giving an assay that could be used for screening purified antibodies from hybridoma lines. The next step was to evaluate the effects of exhausted hybridoma medium on the assay signal.

[0177] Serial dilutions of the hybridoma medium and anti-KLH hybridoma exhaust supernatants were tested in the assay system. When hybridoma supernatants were diluted 1:10 in preparation for preincubation with IGFI/II (final dilution in the assay was

1:60), there was almost no effect of the medium on the assay results. Based on these data, hybridoma supernatants were diluted for preincubation with IGF, providing the preferred 1/60 dilution final dilution in the assay.

[0178] Six hundred eighty-three exhaust supernatants positive for IGF-I and IGF-II binding were examined for their ability to inhibit binding of IGF to IGFBP-3. Inhibition above 50% for IGF-I and above 60% for IGF-II were used as cut-off criteria. The summary results of the screen using these cut-offs are shown in Table 6.

TABLE 6. NUMBERS OF POSITIVE HITS IDENTIFIED IN THE SCREEN

		IGF-I	IGF-II	IGF-I/II
Samples	Inhibition->	>50%	>60%	
376	(plates 1-4)	48	51	19
307	(plates 5-8)	39	78	32
683	Total	87	129	51

[0179] The IGFBP competition assay using the AlphaScreen assay identified 87 samples inhibiting IGF-I binding to IGFBP-3 and 129 samples inhibiting IGF-II binding to IGFBP-3 among 683 tested supernatants. Fifty-one samples demonstrated dual competition of IGF-I and IGF-II. However, in order to more carefully reproduce the function or behavior of the antibodies *in vivo*, where the IGF and the IGFBP complex would be largely preformed, additional assays, as described in example 8 were performed.

EXAMPLE 7

DETERMINATION OF ANTI-IGF-I AND IGF-II ANTIBODY AFFINITY USING BIACORE ANALYSIS (LOW RESOLUTION SCREEN)

Low Resolution Screen of 34 Purified Monoclonal Antibodies

[0180] The label-free surface plasmon resonance (SPR), or Biacore, was utilized to measure the antibody affinity to the antigen. For this purpose, a high-density goat anti-human antibody surface over a CM5 Biacore chip was prepared using routine amine coupling. All the mAbs were diluted to approximately 20 μg/ml in HBS-P running buffer containing 100 μg/ml BSA. Each mAb was captured on a separate surface using a 30-second contact time at 10 μL/min., and a 5-minute wash for stabilization of the mAb baseline.

[0181] IGF-I was injected at 335.3 nM over all surfaces at 23°C for 120 seconds, followed by a 5-minute dissociation, using a flow rate of 100 μL/min. The samples were

prepared in the HBS-P running buffer described above. The surfaces were regenerated after every capture/injection cycle with one 15-second pulse of 146mM phosphoric acid (pH 1.5). The same capture/injection cycles were repeated for each antibody with 114.7 nM IGF-II. Drift-corrected binding data for the 34 mAbs was prepared by subtracting the signal from a control flow cell and subtracting the baseline drift of a buffer injected just prior to each antigen injection. Data were fit globally to a 1:1 interaction model using CLAMP to determine the binding kinetics (David G. Myszka and Thomas Morton (1998) "CLAMP©: a biosensor kinetic data analysis program," TIBS 23, 149-150). A mass transport coefficient was used in fitting the data. The kinetic analysis results of IGF-I and IGF-II binding at 25°C are listed in Table 7 below. The mAbs are ranked from highest to lowest affinity.

TABLE 7. IGF-I AND IGF-II LOW RESOLUTION BIACORE SCREEN OF 34 MONOCLONAL ANTIBODIES

	IGF-II			IGF-I		
Sample	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
7.159.2	3.5×10^6	1.0×10^{-5}*	2.9	4.3×10^6	9.3×10^{-4}	216.0
8.86.1	6.1×10^6	2.4×10^{-4}	39.3	3.4×10^6	1.3×10^{-2}	3823.0
4.25.1	9.3×10^6	4.1×10^{-4}	44.1	5.1×10^6	6.9×10^{-3}	1353.0
7.234.2	6.4×10^6	2.9×10^{-4}	45.3	6.7×10^6	2.2×10^{-3}	328.0
7.160.2	4.6×10^6	2.5×10^{-4}	54.3	5.6×10^6	3.3×10^{-3}	589.0
7.146.3	3.2×10^6	1.8×10^{-4}	56.2	3.8×10^6	8.7×10^{-3}	2289.0
7.34.1	3.0×10^6	1.8×10^{-4}	60.0	5.2×10^6	3.2×10^{-3}	615.0
7.123.1	4.0×10^6	3.4×10^{-4}	85.0	4.3×10^6	9.0×10^{-3}	2093.0
7.202.3	1.8×10^6	1.7×10^{-4}	94.4	1.2×10^6	5.4×10^{-3}	4500.0
4.141.1	4.9×10^6	4.7×10^{-4}	95.9	*	*	*
7.215.2	3.2×10^6	3.3×10^{-4}	103.0	3.6×10^6	2.6×10^{-2}	7222.0
8.287.2	2.4×10^6	2.5×10^{-4}	104.0	7.7×10^5	1.3×10^{-3}	1688.0
8.146.2	7.7×10^6	8.0×10^{-4}	104.0	2.4×10^6	1.3×10^{-2}	5417.0
4.143.2	1.1×10^7	1.2×10^{-3}	109.0	6.4×10^6	1.9×10^{-2}	2969.0
7.251.3	3.5×10^6	4.3×10^{-4}	123.0	4.6×10^6	4.3×10^{-3}	935.0
7.99.1	6.9×10^6	9.9×10^{-4}	143.0	6.0×10^6	4.8×10^{-3}	800.0

	IGF-II			IGF-I		
Sample	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
4.142.2	5.3×10^6	8.5×10^{-4}	160.0	8.5×10^6	1.9×10^{-2}	2235.0
7.41.3	3.2×10^6	5.5×10^{-4}	172.0	5.2×10^6	2.9×10^{-3}	558.0
7.56.3	3.3×10^6	6.0×10^{-4}	182.0	4.8×10^6	3.1×10^{-3}	646.0
7.127.1	4.1×10^6	7.6×10^{-4}	185.0	4.9×10^6	3.5×10^{-3}	714.0
8.8.3	4.0×10^6	7.8×10^{-4}	195.0	3.1×10^6	8.2×10^{-4}	264.0
7.158.2	3.4×10^6	6.7×10^{-4}	197.0	4.4×10^6	2.2×10^{-3}	500.0
7.23.3	3.3×10^6	6.5×10^{-4}	197.0	4.1×10^6	5.8×10^{-3}	1415.0
7.252.1	3.2×10^6	6.5×10^{-4}	203.0	2.3×10^6	2.1×10^{-3}	913.0
7.66.1	3.6×10^6	7.7×10^{-4}	214.0	2.0×10^6	2.5×10^{-3}	1250.0
7.130.1	4.2×10^6	1.0×10^{-3}	238.0	4.6×10^6	1.8×10^{-2}	3913.0
4.90.2	4.9×10^6	1.2×10^{-3}	245.0	*	*	*
7.3.3	3.2×10^6	8.8×10^{-4}	275.0	4.1×10^6	3.9×10^{-3}	951.0
7.118.1	4.6×10^6	1.5×10^{-3}	326.0	5.6×10^6	5.1×10^{-3}	911.0
7.212.1	4.2×10^6	1.6×10^{-3}	381.0	3.1×10^6	6.0×10^{-3}	1935.0
7.175.2	1.3×10^6	7.4×10^{-4}	569.0	1.8×10^6	2.0×10^{-2}	11111.0
4.121.1	5.5×10^{6}*	3.2×10^{-3}*	582.0*	1.5×10^6	2.1×10^{-3}	1400.0
7.85.2	1.9×10^6	1.3×10^{-3}	684.0	2.2×10^6	2.9×10^{-2}	13182.0
7.58.3	8.9×10^6	7.9×10^{-3}	888.0	7.2×10^6	3.2×10^{-2}	4444.0

IGF-I Binding Data

[0182] Most mAbs fit a 1:1 model reasonably well. MAbs 4.90.2 and 4.141.1 were characterized by extremely complex data. These mAbs were listed with an asterisk in Table 7 because no meaningful kinetic constants could be estimated from the 1:1 model fit. The latter off-rate phase appears to be very slow for both of these mAbs (at least 1×10^{-5} sec^{-1}), which might make these two mAbs useful as therapeutic compounds.

IGF-II Binding Data

[0183] Most mAbs fit a 1:1 model reasonably well. The off-rate for mAb 7.159.2 was held constant at 1 X 10^{-5} sec^{-1} because there was not enough decay data to adequately estimate k_d.

[0184] The low-resolution Biacore studies in this example are designed as a semi-quantitative ranking approach. In order to acquire more accurate information regarding the characteristic rate constants and affinities of individual mAbs, high-resolution Biacore studies were carried out as described in Example 8.

EXAMPLE 8

DETERMINATION OF ANTI-IGF-I AND IGF-II ANTIBODY AFFINITY USING BIACORE ANALYSIS (HIGH RESOLUTION SCREEN)

[0185] A high resolution Biacore analysis was performed to further measure the antibody affinity to the antigen. mAbs 7.159.2, 7.234.2, 7.34.1, 7.251.3, and 7.160.2 were each captured and the IGF-I and IGF-II antigens were each injected over a range of concentrations. The resulting binding constants are listed in Table 8.

TABLE 8. ANTI-IGF ANTIBODY AFFINITY DETERMINED BY LOW-AND HIGH-RESOLUTION BIACORE ANALYSIS

mAb	Low resolution K_D (pM)		High Resolution K_D (pM)	
	IGF-I	IGF-II	IGF-I	IGF-II
7.159.2	216.0	2.9	294.0	1.9
7.234.2	328.0	45.3	3760.0	295.0
7.34.1	615.0	60.0	436.0 421.0	164.0 162.0
7.251.3	935.0	123.0	452.0	47.4
7.160.2	589.0	54.3	2800.0	237.0

[0186] Thus, embodiments of the invention can include an antibody that will preferentially bind to IGF-II, but that will cross-react with IGF-I, binding to IGF-II with higher affinity than to IGF-I. For example, the antibody can bind to IGF-II with 2.5 times greater affinity than to IGF-I. In certain embodiments, the antibody can bind to IGF-II with at least 5, at least 10, at least 25, at least 50 or at least 150 times greater affinity than to IGF-I.

Screening of Preformed IGF-I/GFBP-3 Complexes

[0187] The IGFBP competition assay described in Example 6 identified 87 samples inhibiting IGF-I binding to IGFBP-3 and 129 samples inhibiting IGF-II binding to IGFBP-3 among 683 tested supernatants. Fifty-one samples demonstrated dual competition of IGF-I and IGF-II. However, in order to more carefully reproduce the function or behavior of the antibodies *in vivo*, where the IGF and the IGFBP complex would be largely preformed, the following Biacore assays were performed on selected antibodies.

[0188] Six selected antibodies were screened to determine whether they bind IGF-I or IGF-II in complex with IGFBP. All six of the selected mAbs (7.159.2, 7.146.3, 7.34.1, 7.251.3, 7.58.3, and unrelated control antibody ABX-MA1) were covalently immobilized to a high surface capacity (5,400-12,800 RUs) on two CM5 Biacore chips using routine amine coupling with a Biacore 2000 instrument. One flow cell on each CM5 chip was activated and blocked (no mAb immobilized) for use as a control surface.

[0189] Next, IGF-I and IGFBP-3 were mixed together in Hepes buffered saline, pH 7.4, 0.005% P-20, 100 µg/ml BSA (HBS-P), to make a final solution of 193 nM and 454 nM, respectively. IGF-II and IGFBP-3 were mixed together to make a final solution of 192 nM and 455 nM, respectively. Under these conditions, IGF-I and IGF-II were 99.97% complexed by IGFBP-3. Equilibrium was reached within minutes under these conditions. Solutions of complexed IGF-I/IGFBP-3 and IGF-II/IGFBP-3 were flowed across the various mAb surfaces at 40 µL/min and 23 °C, for 180 seconds and dissociation was followed for 120 seconds. Uncomplexed IGF-I and IGF-II were then flowed across each surface at 193 nM and 192 nM, respectively, and IGFBP-3 was flowed across each surface at 454 nM. The surfaces were regenerated with a 20 second pulse of 10 mM glycine, pH 2.0.

[0190] The sensorgrams were processed using the program Scrubber by subtracting the bulk refractive index change and any nonspecific binding signal of the analyte to the blank surface from the binding signal from surfaces with mAb immobilized. After blank correction subtraction, the sensorgrams were referenced a second time by subtracting an average sensorgram for buffer injections over a specific flow cell. This "double reference" corrected the mAb binding sensorgrams for any systematic errors present on a particular flow cell.

[0191] Complexed and uncomplexed IGF-I/IGFBP-3 and IGF-II/IGFBP-3 bound fairly weakly to the bound antibodies, with a rough estimate of the nonspecific binding interaction being a K_D>1 μM for all six mAbs, including negative control ABX-MA1 (See Table 9). However, with ABX-MA1 the IGF-I/II binding was weak and indicated nonspecific binding interactions occurred with all these three analytes. Apparently, the IGF/IGFBP-3 complexes bind slightly stronger to all these mAbs than IGFBP-3 does alone. However, because both IGF-I, IGF-II and IGBP-3 appear to bind nonspecifically to these mAbs themselves, when they are both bound together, this results in an even "stickier" nonspecific binding protein complex, which explains the greater binding signal for the complex. The IGF-I/II/IGFBP-3 complexes and IGFBP-3 bound to the control surface significantly also indicating the nonspecificity of these two proteins. However, in the sensorgrams below this background binding is subtracted out in the first reference during data processing, as described above.

[0192] This experiment suggests that although 51 of the samples were previously shown to inhibit binding of IGF-I/II to IGFBP3 (Example 6), the antibodies may also bind to the IGF/IGFBP complex *in vitro*.

TABLE 9. BINDING SUMMARY FOR IGF-I/IGFBP-3 AND IGF-II/IGFBP-3 BINDING TO SIX MABS.

mAb	IGF-I/IGFBP-3 complex	IGF-II/IGFBP-3 complex	IGFBP-3	IGF-I (or II)
7.159.2	+	+	+	+++
7.146.3	+	++	+	+++
7.34.1	+	++	+	+++
7.251.3	++	++	++	+++
7.58.3	++	++	++	+++
ABX-MA1	+	+	+	+

+, slight binding relative to IGF-I or IGF-II to the mAb
++, medium binding relative to IGF-I or IGF-II to the mAb
+++, strong binding relative to IGF-I or IGF-II binding to the mAb
*These ratings DO NOT indicate the K_D for these interactions.

EXAMPLE 9

DETERMINATION OF ANTI-INSULIN ANTIBODY AFFINITY USING BIACORE ANALYSIS (LOW RESOLUTION SCREEN)

[0193] The cross-reactivity of antibodies to IGF-I/II was further investigated by measuring the affinity of the mAbs to human insulin. IGF-I/II antibodies were immobilized to the CM5 Biacore chips, and insulin in solution was injected for the determination of the on-rate and off-rate. Five mAbs, including 7.234.2, 7.34.1, 7.159.2, 7.160.2, and 7.251.3, were tested in this experiment. Insulin diluted to 502 nM in the running buffer was injected over all capture surfaces.

[0194] No insulin binding to any of the mAbs was observed at 502 nM insulin. These results suggest that there is no apparent cross-reactivity of the IGF-I/II mAbs with insulin.

EXAMPLE 10

BINNING OF ANTIBODIES

[0195] Epitope binning was performed to determine which of the anti-IGF-I/II antibodies would cross compete with one another, and thus were likely to bind to the same epitope on IGF-I/II. The binning process is described in U.S. Patent Application

20030175760, also described in Jia et al., J. Immunol. Methods, (2004) 288:91-98, both of which are incorporated by reference in entirety. Briefly, Luminex beads were coupled with mouse anti-huIgG (Pharmingen #555784) following the protein coupling protocol provided on the Luminex website. Pre-coupled beads were prepared for coupling to primary unknown antibody using the following procedure, protecting the beads from light. Individual tubes were used for each unknown supernatant. The volume of supernatant needed was calculated using the following formula: (nX2+10) x 50 µl (where n = total number of samples). A concentration of 0.1 µg/ml was used in this assay. The bead stock was gently vortexed, and diluted in supernatant to a concentration of 2500 of each bead in 50 µl per well or $0.5X10^5$ beads/ml.

[0196] Samples were incubated on a shaker in the dark at room temperature overnight.

[0197] The filter plate was pre-wetted by adding 200 µl wash buffer per well, which was then aspirated. 50 µl of each bead was added to each well of the filter plate. Samples were washed once by adding 100 µl/well wash buffer and aspirating. Antigen and controls were added to the filter plate at 50 µl/well. The plate was covered, incubated in the dark for 1 hour on a shaker, and then samples were washed 3 times. A secondary unknown antibody was then added at 50 µl/well. A concentration of 0.1 µg/ml was used for the primary antibody. The plate was then incubated in the dark for 2 hours at room temperature on a shaker, and then samples were washed 3 times. 50 µl/well of biotinylated mouse anti-human IgG (Pharmingen #555785) diluted at 1:500 was added, and samples were incubated in the dark for 1 hour with shaking at room temperature.

[0198] Samples were washed 3 times. 50 µl/well Streptavidin-PE at a 1:1000 dilution was added, and samples were incubated in the dark for 15 minutes with shaking at room temperature. After running two wash cycles on the Luminex100, samples were washed 3 times. Contents in each well were resuspended in 80 µl blocking buffer. Samples were carefully mixed with pipetting several times to resuspend the beads. Samples were then analyzed on the Luminex100. Results are presented below in Table 10.

TABLE 10. BINS FOR TOP 34 IGF-I/II ANTIBODIES POSITIVE IN FUNCTIONAL ASSAY

IGF-I			
Bin 1	Bin 2	Bin 3	No Bin
7.3.3	7.58.3	7.175.2	7.215.2
7.23.3	8.287.2	7.85.2	
7.66.1		4.90.2	
7.56.3		4.141.1	
7.160.2		7.146.3	
7.41.3		7.34.1	
4.121.1		7.159.2	
8.146.2		7.251.3	
7.252.1			
7.123.1			
7.212.1			
7.234.2			
7.99.1			
7.127.1			
4.25.1			
8.8.3			
7.158.2			
7.202.3			
7.130.1			
8.86.1			
4.142.2			
7.118.1			
4.143.2			

IGF-II			
Bin 1	Bin 2	Bin 3	No Bin
7.3.3	7.158.2	7.175.2	7.215.2
7.127.1	8.146.2	4.90.2	
7.99.1	7.252.1	4.141.1	
7.123.1	8.86.1	7.85.2	
7.212.1		7.251.3	
7.234.2		7.159.2	
7.130.1		7.146.3	
7.118.1		7.34.1	
8.287.2			
7.58.3			
7.66.1			
7.41.3			
7.56.3			
7.160.2			
7.202.3			
8.8.3			
4.25.1			
7.23.3			
4.142.2			
4.143.2			
4.121.1			

EXAMPLE 11

STRUCTURAL ANALYSIS OF ANTI-IGF-I/II ANTIBODIES

[0199] The variable heavy chains and the variable light chains of several antibodies were sequenced to determine their DNA sequences. The complete sequence information for the anti-IGF-I/II antibodies is provided in the sequence listing with nucleotide and amino acid sequences for each gamma and kappa chain combination. The variable heavy sequences were analyzed to determine the VH family, the D-region sequence and the J-region sequence. The sequences were then translated to determine the primary

amino acid sequence and compared to the germline VH, D and J-region sequences to assess somatic hypermutations.

[0200] The alignment of the sequences of these antibodies to their germline genes are shown in the following tables. Table 11 is a table comparing the antibody heavy chain regions to their cognate germ line heavy chain region. Table 12 is a table comparing the antibody kappa light chain regions to their cognate germ line light chain region. Mutations away from germline are shown as the new amino acid.

[0201] The variable (V) regions of immunoglobulin chains are encoded by multiple germ line DNA segments, which are joined into functional variable regions (V_HDJ_H or V_KJ_K) during B-cell ontogeny. The molecular and genetic diversity of the antibody response to IGF-I/II was studied in detail. These assays revealed several points specific to anti-IGF-I/II antibodies.

[0202] Analysis of five individual antibodies specific to IGF-I/II resulted in the determination that the antibodies were derived from three different germline VH genes, four of them from the VH4 family, with 2 antibodies being derived from the VH4-39 gene segment. Tables 11 and 12 show the results of this analysis.

[0203] It should be appreciated that amino acid sequences among the sister clones collected from each hybridoma are identical. For example, the heavy chain and light chain sequences for mAb 7.159.2 are identical to the sequences shown in Tables 11 and 12 for mAb 7.159.1.

[0204] The heavy chain CDR1s of the antibodies of the invention have a sequence as disclosed in Table 11. The CDR1s disclosed in Table 11 are of the Kabat definition. Alternatively, the CDR1s can be defined using an alternative definition so as to include the last five residues of the FR1 sequence. For example, for antibody 7.159.1 the FR1 sequence is QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS (SEQ ID NO.: 93) and the CDR1 sequence is GYTFTSYDIN (SEQ ID NO.: 94); for antibody 7.158.1 the FR1 sequence is QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS (SEQ ID NO.: 95) and the CDR1 sequence is GGSIRSSSYYWG (SEQ ID NO.: 96); for antibody 7.234.1 the FR1 sequence is QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS (SEQ ID NO.: 97) and the CDR1 sequence is GGSINSSSNYWG (SEQ ID NO.: 98); for antibody 7.34.1 the FR1 sequence is QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS (SEQ ID NO.: 99) and the CDR1 sequence is

GGSISSYYWS (SEQ ID NO.: 100); and for antibody 7.251.3 the FR1 sequence is QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS (SEQ ID NO.: 101) and the CDR1 sequence is GGSISSYYWS (SEQ ID NO.: 102).

[0205] It should also be appreciated that where a particular antibody differs from its respective germline sequence at the amino acid level, the antibody sequence can be mutated back to the germline sequence. Such corrective mutations can occur at one, two, three or more positions, or a combination of any of the mutated positions, using standard molecular biological techniques. By way of non-limiting example, Table 12 shows that the light chain sequence of mAb 7.34.1 (SEQ ID NO.: 12) differs from the corresponding germline sequence (SEQ ID NO.:80) through a Pro to Ala mutation (mutation 1) in the FR1 region, and via a Phe to Leu mutation (mutation 2) in the FR2 region. Thus, the amino acid or nucleotide sequence encoding the light chain of mAb 7.34.1 can be modified to change mutation 1 to yield the germline sequence at the site of mutation 1. Further, the amino acid or nucleotide sequence encoding the light chain of mAb 7.34.1 can be modified to change mutation 2 to yield the germline sequence at the site of mutation 2. Still further, the amino acid or nucleotide sequence encoding the light chain of mAb 7.34.1 can be modified to change both mutation 1 and mutation 2 to yield the germline sequence at the sites of both mutations 1 and 2.

TABLE 11. HEAVY CHAIN ANALYSIS

Chain Name	SEQ ID NO.	V	D	J	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Germ-line**	75	VH1-8	N.A.	JH6B	QVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYTFT	SYDI N	WVRQATG QGLEWMG	WMNPNSGNT GYAQKFQG	RVTMTRNTSISTAYMELS SLRSEDTAVYYCAR	##YYYYY GMDV	WGQGTT VTVSSA
7_159_1	6	"	"	"	QVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYTFT	SYDI N	WVRQATG QGLEWMG	WMNPNSGNT GYAQKFQG	RVTMTRNTSISTAYMELS SLRSEDTAVYYCAR	DPYYYYY GMDV	WGQGTT VTVSSA
Germline	77	VH4-39	D6-19	JH2	QLQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSGGSIS	SSSY YWG	WIRQPPG KGLEWIG	SIYYSGSTY YNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCAR	####SS# #WYFDL	WGRGTL VTVSSA
7_158_1	2	"	"	"	QLQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSGGSIR	SSSY YWG	WIRQPPG KGLEWIG	GIYYSGSTY YNPSLKS	RVTMSVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCAR	QRGHSSG WWYFDL	WGRGTL VTVSSA
7_234_1	18	"	"	"	QLQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSGGSIN	SSSN YWG	WIRQPPG KGLAWIG	GIYYSGSTY YNPSLRS	RVTMSVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCAR	QRGHSSG WWYFDL	WGRGTL VTVSSA
Germline	79	VH4-59	D1-20	JH6B	QVQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSGGSIS	SYYW S	WIRQPPG KGLEWIG	YIYYSGSTN YNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCA#R	ITGT### GMDV	WGQGTT VTVSSA
7_34_1	10	"	"	"	QVQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSGGSIS	SYYW S	WIRQPPG RGLEWIG	YFFYSGYTN YNPSLKS	RVTMSVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCAC	ITGTTKG GMDV	WGQGAT VTVSSA
7_251_3	14	"	"	"	QVQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSGGSIS	SYYW S	WIRQPPG KGLEWIG	YFFYSGYTN YNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCAC	ITGTTKG GMDV	WGQGTT VTVSSA

* The hatch designation (#) indicates a space in the germline and is used to show a proper alignment with the antibody sequences shown in the table.

** The germline sequences shown in the above table are for alignment purposes, and it should be realized that each individual antibody region exists in its own location within the variable regions of immunoglobulin germline DNA segments *in vivo*.

TABLE 12. LIGHT CHAIN ANALYSIS

Chain Name	SEQ ID NO.	V	J	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Germlin e	76	V1-19	JL 2	QSVLTQPPSVSA APGQKVTISC	SGSSSNI GNNYVS	WYQQLPGT APKLLIY	DNNKRPS	GIPDRFSGSKSGTSAT LGITGLQTGDEADYYC	GTWDSSL SA##V	FGGGTK LTVLG
7_159_1	8	"	"	QSVLTQPPSVSA APGQKVTISC	SGSSSNI ENNHVS	WYQQLPGT APKLLIY	DNNKRPS	GIPDRFSGSKSGTSAT LGITGLQTGDEADYYC	ETWDTSL SAGRV	FGGGTK LTVLG
Germlin e	78	L5	JK 3	DIQMTQSPSSVS ASVGDRVTITC	RASQGIS SWLA	WYQQKPGK APKLLIY	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYC	QQANSFP FT	FGPGTK VDIKR
7_158_1	4	"	"	DIQMTQSPSSVS ASVGDSVTITC	RASQGIS SYLA	WYQQKPGK APKLLIY	AASSLQS	GVPSRFSGNGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYC	QQANNFP FT	FGPGTK VDIKR
7_234_1	20	"	"	DIQMTQSPSSVS ASVGDRVTITC	RASRGIS SWLA	WYQQRPGK APKLLIY	TASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYC	QQANSFP FT	FGPGTK VDIKR
Germline	80	V1-13	JL 2.	QSVLTQPPSVSG APGQRVTISC	TGSSSNI GAGYDVH	WYQQLPGT APKLLIY	GNSNRPS	GVPDRFSGSKSGTSAS LAITGLQAEDEADYYC	QSYDSSL SGSV	FGGGTK LTVLG
7_34_1	12	"	"	QSVLTQAPSVSG APGQRVTISC	TGRSSNI GAGYDVH	WYQQFPGT APKLLIY	GNSNRPS	GVPDRFSGSKSGTSAS LAITGLQAEDEADYYC	QSYDSSL SGSV	FGGGTK LTVLG
7_251_3	16	"	"	QSVLTQPPSVSG APGQRVTISC	TGSSSNI GAGYDVH	WYQQLPGT APKLLIY	GNNNRPS	GVPDRFSGSKSGTSAS LAITGLQADDEADYYC	QSFDSSL SGSV	FGGGTK LTVLG

* The hatch designation (#) indicates a space in the germline and is used to show a proper alignment with the antibody sequences shown in the table.

** The germline sequences shown in the above table are for alignment purposes, and it should be realized that each individual antibody region exists in its own location within the variable regions of immunoglobulin germline DNA segments *in vivo*.

EXAMPLE 12

INHIBITION OF IGF-I AND IGF-II-INDUCED PHOSPHORYLATION OF hIGF-IR ECTOPICALLY EXPRESSED IN NIH3T3 CELLS

[0206] IGF ligands exert their proliferation and anti-apoptosis functions by activating receptor tyrosine kinase activity in the IGF-IR receptor. In order to evaluate the anti IGF-I/II antibodies for their ability to inhibit IGF-induced phosphorylation of IGF-IR, NIH3T3 cells ectopically expressing hIGF-IR, were used in the following assay.

[0207] NIH3T3 cells ectopically expressing the human IGF-IR were seeded in a 96-well plate at a density of 10,000 cells per well and incubated overnight in starvation media (1% charcoal stripped FBS). The following day, the growth medium was discarded, the wells were gently washed twice with PBS, and 100µL of serum-free medium (0% FBS) was added to starve the cells. After 1-2 hours, 100ul of serum-free medium with 0.05% BSA containing either IGF-I (10nM) or IGF-II (10nM) that was pre-incubated for 60 minutes at 37°C with various antibody concentrations, was added to the cells in triplicate. The stimulation was allowed to occur for 10 minutes at 37°C, after stimulation, media removed and 100uL 3.7%fromaldehyde in PBS/3%BSA added to each well and incubated at RT for 20 min. The cells were then washed 2X with PBS and 100uL permeabilization buffer (0.1% Triton-X in 3%BSA/PBS) was added to each well. This was allowed to incubate at RT for 10 min, discarded and 100ul of 0.6% hydrogen peroxide in PBS/3% BSA was added to inactivate any endogenous peroxidase activity. After a 20min RT incubation, the cells were washed 3X with PBS/0.1% Tween-20 and blocked by adding 100uL 10%FBS in PBS/0.1% Tween-20 at RT for 1hr. The Blocking Buffer was then removed and 50uL anti-phospho IGFIR antibody at 1ug/ml (cat#44-804, BioSource) was added to each well in 10%FBS/PBS-T. After a 2hr RT incubation cells were washed 3X with PBST soaking for 5 minutes between each wash. After the washes 50ul/well of a Goat anti Rabbit IgGFc-HRP secondary antibody diluted 1:250 in Blocking Buffer was added to each of the well. After a 1 hour RT incubation the cells were washed 3X for 5 minutes with PBST as before and tapped dry. 50ul of ECL reagent (DuoLux) was then added and RLUs was read immediately.

[0208] Thirty-two (32) antibody lines were screened, and two independent assays were performed for each antigen. The results for the top ten antibodies are summarized in Table 13 below.

TABLE 13. SUMMARY OF INHIBITION OF IGF-DEPENDENT IGF-IR PHOSPHORYLATION IN NIH3T3 CELLS

	IGF-I pTYR Results (n=2)				IGF-II pTYR Results (n=2)			
	% MAX Activation		EC50 (nM)*		% MAX Activation		EC50 (nM)*	
mAb ID	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
7.159.2	16.5%	6.6%	7.4	0.8	28.6%	5.4%	3.1	0.2
7.34.1	14.2%	1.8%	9.4	0.8	21.5%	3.9%	2.5	0.1
7.146.3	19.5%	3.9%	19.0	5.7	23.6%	2.1%	3.6	0.2
7.251.3	16.9%	5.4%	14.5	0.7	15.9%	1.5%	3.0	0.9
7.234.2	21.1%	3.0%	24.3	1.0	21.1%	0.1%	7.7	0.1
7.160.2	33.6%	6.4%	22.9	0.1	21.5%	0.6%	4.7	0.2
7.158.2	22.7%	0.9%	28.3	0.5	33.7%	2.4%	11.3	3.2
7.56.3	31.3%	2.2%	25.1	4.3	21.2%	0.2%	6.3	0.5
7.118.1	24.1%	5.2%	40.8	2.6	21.8%	3.2%	13.9	5.3
7.41.3	33.1%	6.1%	47.1	7.0	29.5%	4.4%	3.5	4.0

*These assays may have been run under antigen limiting conditions given the mAb KD for IGF-I and IGF-II.

EXAMPLE 13

INHIBITION OF IGF-I AND IGF-II-INDUCED PROLIFERATION OF NIH3T3 CELLS TRANSFECTED WITH HIGF-IR

[0209] As discussed above, one of the criteria for neutralizing IGF-I/II antibodies is the ability to inhibit IGF-induced proliferation. In order to evaluate the antibodies for their ability to inhibit IGF-induced proliferation, NIH3T3 cells ectopically expressing hIGF-IR, were used in the following assay.

[0210] NIH3T3 cells ectopically expressing hIGF-IR were seeded in a 96-well plate at a density of 5000 cells per well and cultured overnight in starvation medium (1% charcoal stripped FBS). The following day, the growth medium was discarded, the wells were gently washed twice in medium without serum, and 100μL of serum-free medium was added to starve the cells. 100μL of starvation media containing 15ng/ml IGFI or 50ng/ml IGFII pre-incubated for 30 min at 37°C with various antibody concentrations was added to the cells in duplicate or triplicate. Following a 20hr incubation cells are

pulsed with BrdU for 2hrs and the degree of incorporation (proliferation) was quantitated using the Cell Proliferation ELISA kit from Roche (Roche, Cat#1 647 229).

[0211] A total of 32 antibody lines were screened, and two or three independent assays were performed for each antigen. The results for the top 10 antibodies are summarized in Table 14 below.

TABLE 14. SUMMARY OF INHIBITION OF IGF-DEPENDENT PROLIFERATION OF NIH3T3/hIGF-IR CELLS

	IGF-I Proliferation Assay				IGF-II Proliferation Assay			
	% Inhibition		EC50 (nM)*		% Inhibition		EC50 (nM)*	
mAb ID	Mean (n=3)	SD	Mean (n=3)	SD	Mean (n=2)	SD	Mean (n=2)	SD
7.159.2	77.0%	9.6%	24.1	5.9	99.3%	0.6%	7.6	2.5
7.34.1	72.6%	5.6%	23.4	8.1	73.6%	11.8%	16.3	0.4
7.146.3	65.3%	5.5%	37.2	4.5	82.0%	6.9%	15.9	3.4
7.251.3	72.4%	15.3%	38.9	4.3	79.2%	7.8%	22.0	3.7
7.234.2	67.3%	6.9%	40.6	4.6	62.1%	17.2%	24.3	2.4
7.160.2	62.8%	5.7%	47.6	10.7	45.9%	0.8%	24.7	2.8
7.158.2	57.4%	19.5%	42.8	1.7	54.6%	6.6%	36.0	4.2
7.56.3	50.2%	7.8%	65.7	31.9	48.0%	10.9%	38.3	7.5
7.118.1	59.4%	14.5%	1626.6	2714.5	68.3%	0.8%	49.9	3.8
7.41.3	29.5%	14.7%	76.3	35.9	51.9%	13.7%	61.9	23.7

*These assays may have been run under antigen limiting conditions given the mAb KD for IGF-I and IGF-II.

EXAMPLE 14

INHIBITION OF IGF-I AND IGF-II-INDUCED PHOSPHORYLATION OF hIGF-IR EXPRESSED IN BxPC3 HUMAN PANCREATIC TUMOR CELLS

[0212] IGF-I/II exert their proliferation and anti-apoptosis functions by activating receptor tyrosine kinase activity in the IGF-IR receptor. In order to evaluate the antibodies for their ability to inhibit IGF-induced phosphorylation of IGF-IR, BxPC3 human pancreatic tumor cells, which express endogenous hIGF-IR, were used in the following assay.

[0213] BxPC3 cells were seeded in a 96-well plate at a density of 55,000 cells per well and incubated overnight in regular growth medium. The following day, the growth medium was discarded, the wells were gently washed twice in medium without serum, and 100μL of serum-free medium was added to starve the cells. After 24 hours,

the medium was discarded, and the cells were gently washed once in medium without serum. Serum-free medium with 0.05% BSA containing either IGF-I (20ng/ml) or IGF-II (75ng/ml) was pre-incubated for 30 minutes at 37°C with various antibody concentrations, and 100µL was then added to the cells in triplicate. The plates were incubated for 15 minutes at 37°C, and were subsequently rinsed with cold PBS. 100µL of lysis buffer was added to the wells and the plates were incubated for 30 minutes at 4°C. The lysates were spun down at 2000 rpm for 10 minutes at 4°C, and the supernatant was collected. IGF-IR phosphorylation was quantitated using the Duoset human phosphor-IGF-IR ELISA kit (R&D Systems, Cat. No. DYC1770).

[0214] Ten antibody lines were screened, and two independent assays were performed for each antigen. The results are summarized in Table 15 below.

TABLE 15. SUMMARY OF INHIBITION OF IGF-DEPENDENT IGF-IR PHOSPHORYLATION

	IGF-I pTYR Results (n=2)				IGF-II pTYR Results (n=2)			
	n=1		n=2		n=1		n=2	
mAb ID	Max % Inhibition (333.3nM)	EC50 (nM)	Max % Inhibition (333.3nM)	EC50 (nM)	Max % Inhibition (333.3nM)	EC50 (nM)	*Max % Inhibition (133.3nM)	EC50 (nM)
7.159.2	100.0	3.3	100.0	1.6	100.0	1.6	91.2	1.7
7.34.1	100.0	5.9	98.5	3.8	100.0	2.0	89.7	1.9
7.146.3	96.4	16.1	94.2	10.7	100.0	2.0	87.9	2.0
7.251.3	95.7	7.5	95.2	5.3	100.0	N.D.	91.3	2.6
7.234.2	97.3	5.1	91.5	2.9	98.5	1.9	77.3	2.3
7.160.2	93.4	5.3	89.2	3.1	88.6	1.7	73.2	2.5
7.158.2	92.9	4.5	89.4	3.6	92.4	N.D.	74.0	4.2
7.56.3	84.9	N.D.	88.7	6.5	91.4	10.1	66.2	5.1
7.118.1	90.5	13.1	90.6	11.8	95.7	17.9	78.0	13.1
7.41.3	88.6	6.5	86.5	6.5	88.6	4.5	70.6	3.1

*333nM for the last 3 antibodies.

N.D.: Not Determined

EXAMPLE 15

INHIBITION OF IGF-I AND IGF-II-INDUCED PROLIFERATION OF BxPC3 HUMAN PANCREATIC TUMOR CELLS

[0215] As discussed above, one of the criteria for neutralizing IGF antibodies is the ability to inhibit IGF-induced proliferation. In order to evaluate the antibodies for

their ability to inhibit IGF-induced proliferation, BxPC3 human pancreatic tumor cells, which express endogenous hIGF-IR, were used in the following assay.

[0216] BxPC3 cells were seeded in a 96-well plate at a density of 2000 cells per well and cultured overnight in regular growth medium. The following day, the growth medium was discarded, the wells were gently washed twice in medium without serum, and 100μL of serum-free medium with 10μg/ml transferrin and 0.1% BSA (assay medium) was added to starve the cells. After 24 hours, the medium was discarded, the cells were gently washed once in medium without serum, and 100μL of assay medium containing 20ng/ml IGF preincubated for 30 min at 37°C with various antibody concentrations was added to the cells in duplicate or triplicate. The plates were incubated for 3 days, and proliferation was quantitated using the CellTiter-Glo reagent (Promega).

[0217] Ten antibody lines were screened, and two or three independent assays were performed for each antigen. The results are summarized in Table 16 below. Based on the functional data below and the data from the Example 14, the four best antibodies were selected. IGF-I-induced proliferation assay data was excluded from the selection criteria because of the high assay variability observed.

TABLE 16. SUMMARY OF INHIBITION OF IGF-DEPENDENT PROLIFERATION OF BxPC3 HUMAN PANCREATIC TUMOR CELLS

	IGF-II Proliferation Results (n=2)			
	n=1		**n=2**	
MAb ID	**Max % Inhibition (333.3nM)**	**EC50 (nM)**	***Max % Inhibition (133.3nM)**	**EC50 (nM)**
7.159.2	120.0	0.8	118.3	0.9
7.34.1	117.0	0.5	109.0	6.7
7.146.3	128.7	3.0	119.5	7.3
7.251.3	128.5	0.5	105.3	4.4
7.234.2	111.7	N.D.	200.7	2.6
7.160.2	79.7	1.1	155.7	N.D.
7.158.2	86.3	0.0013	148.3	N.D.
7.56.3	87.0	N.D.	112.3	102.0
7.118.1	114.0	34.0	137.0	54.7
7.41.3	102.0	N.D.	73.0	N.D.

*333nM for the last 3 antibodies

N.D.: Not Determined

EXAMPLE 16

DETERMINATION OF CROSS-REACTIVITY WITH MOUSE IGF-I, IGF-II AND INSULIN

[0218] One objective was to develop antibodies that were specific to IGF-I and IGF-II but that have no cross-reactivity with insulin. In order to perform later experiments in animals, the antibodies should also cross-react with murine IGF-I/II but not murine insulin. Accordingly, ELISA assays were performed to determine whether selected antibodies were able to cross-react with murine IGFs or insulin.

[0219] As shown in Table 17, five of the top ten antibodies were tested for cross-reactivity with mouse or rat insulin by ELISA. The ELISAs showed that these antibodies had no cross-reactivity with mouse or rat insulin, compared to negative control antibody PK16.3.1 and in contrast to positive control anti-rat insulin antibody.

TABLE 17. CROSS-REACTIVITY WITH MOUSE INSULIN

	OD 450 with different Ag		
Antibodies	**mouse Insulin**	**Rat Insulin**	**No Ag**
7.159.2	0.52	0.52	0.56
7.160.2	0.60	0.57	0.62
7.34.1	0.48	0.47	0.55
7.251.3	0.55	0.53	0.56
7.234.2	0.51	0.49	0.66
Serum	1.28	1.23	1.34
anti Rat Insulin	2.52	3.06	0.10
PK16.3.1	0.58	0.58	0.62

EXAMPLE 17

INHIBITION OF MOUSE IGF-I AND IGF-II-INDUCED PHOSPHORYLATION OF HUMAN IGF-IR ECTOPICALLY EXPRESSED IN NIH3T3 CELLS

[0220] The monoclonal antibodies with cross-reactivity with mouse IGF-I and IGF-II were further tested in order to determine the extent they inhibit IGF-induced phosphorylation of the IGF-IR. This assay was performed as previously described using NIH3T3 cells ectopically expressing the hIGF-IR receptor. The results of this assay are summarized in Table 18.

[0221] NIH3T3 cells ectopically expressing the human IGF-IR were seeded in a 96-well plate at a density of 10,000 cells per well and incubated overnight in starvation media (1% charcoal stripped FBS). The following day, the growth medium was

discarded, the wells were gently washed twice with PBS, and 100μL of serum-free medium (0% FBS) was added to starve the cells. After 1-2 hours, 100ul of serum-free medium with 0.05% BSA containing either mouse IGF-I (10nM) or IGF-II (10nM) (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN Cat. No. 791-MG and 792-MG respectively) that was pre-incubated for 60 minutes at 37°C with various antibody concentrations, was added to the cells in triplicate. The stimulation was allowed to occur for 10 minutes at 37°C, after stimulation, media removed and 100uL 3.7% formaldehyde in PBS/3%BSA added to each well and incubated at RT for 20 min. The cells were then washed 2X with PBS and 100uL permeabilization buffer (0.1% Triton-X in 3%BSA/PBS) was added to each well. This was allowed to incubate at RT for 10 min, discarded and 100ul of 0.6% hydrogen peroxide in PBS/3% BSA was added to inactivate any endogenous peroxidase activity. After a 20min RT incubation, the cells were washed 3X with PBS/0.1% Tween-20 and blocked by adding 100uL 10%FBS in PBS/0.1% Tween-20 at RT for 1hr. The Blocking Buffer was then removed and 50uL anti-phospho IGFIR antibody at 1ug/ml (cat#44-804, BioSource) was added to each well in 10%FBS/PBS-T. After a 2hr RT incubation cells were washed 3X with PBST soaking for 5 minutes between each wash. After the washes 50ul/well of a Goat anti Rabbit IgGFc-HRP secondary antibody diluted 1:250 in Blocking Buffer was added to each of the well. After a 1 hour RT incubation the cells were washed 3X for 5 minutes with PBST as before and tapped dry. 50ul of ECL reagent (DuoLux) was then added and RLUs was read immediately.

TABLE 18. INHIBITION OF MOUSE IGF-INDUCED PHOSPHORYLATION OF hIGF-IR

	Mouse IGF-I EC50 (nM)		**Mouse IGF-II EC50 (nM)**	
mAb ID	**n=1**	**n=2**	**n=1**	**n=2**
7.159.2	2.8	5.7	3.1	5.0
7.34.1	6.0	10.2	4.0	9.7
7.251.3	6.7	10.6	5.4	8.7
7.234.2	46.0		36.1	
7.160.2	49.5		225.2	

EXAMPLE 18

INHIBITION OF THE GROWTH OF NIH3T3 CELLS EXPRESSING IGF-II AND IGF-1R *IN VIVO* IN NUDE MICE

[0222] In order to evaluate the antibodies for their ability to inhibit IGF-II-induced proliferation *in vivo*, the following experiments were performed.

[0223] Female nude mice 6-8 weeks of age (supplied by Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA) were implanted subcutaneously with $5x10^6$ Clone 32 cells (NIH3T3 cells ectopically overexpressing human IGF-II and human IGF-1R). The cells were suspended in PBS in a total inoculum volume of 330 µl. The tumors were allowed to grow to 100-200mm^3 prior to treatment with monoclonal antibodies 7.159.2, 7.34.1 and 7.251.3. Antibodies or IgG2 isotype control antibody suspended in PBS were administered intraperitoneally to randomized groups of 9 or 12 mice weekly for 4 weeks at 5 or 50 mg/kg from Day 22. PBS was administered as a vehicle control to a further group of 11 mice weekly for 4 weeks from Day 22. Tumor size and body weight was measured 2-3 times per week. The results are summarized in Figures 1 and 2.

[0224] Significant tumor growth inhibition was observed (see Figure 1) with no significant weight loss occurring in any group (see Figure 2). Antibodies 7.159.2, 7.34.1 and 7.251.3 significantly inhibited the growth of Clone 32 tumors at 5 and 50 mg/kg/week (see Figure 1).

EXAMPLE 19

INHIBITION OF THE GROWTH OF NIH3T3 CELLS EXPRESSING IGF-I AND IGF-1R IN VIVO IN NUDE MICE

[0225] In the previous example, the antibodies were shown to inhibit IGF-II-induced proliferation *in vivo*. In order to evaluate the antibodies for their ability to inhibit IGF-I-induced proliferation *in vivo*, the following experiments were performed.

[0226] Female nude mice (Alderley Park strain derived from Swiss nu/nu mice strain, supplied by AstraZeneca) were implanted with $5x10^6$ viable P12 cells [NIH3T3 cells ectopically overexpressing human IGF-I and human IGF-1R (Pietrzkowski et al, Cell Growth & Differentiation, 3, 199-205, 1992)] subcutaneously in the left flank. The cells were suspended in PBS in a total inoculum volume of 0.1 ml. Two groups of animals (each n=10) were dosed twice weekly from day of NIH3T3 cell implant with either mAb 7.159.2 at 1.0 mg per mouse or with an equivalent volume of PBS vehicle (0.3 ml) for the same schedule. All doses were given intraperitoneally via the (i.p.) route. Animal body weights were measured daily and, once established, tumor measurements

were taken twice weekly using calipers. The volume for all measurable tumors was calculated from the caliper measurements assuming an ovoid shape. The results are summarized in Figure 3.

[0227] As shown in Figure 3, significant tumor growth inhibition was observed with mAb 7.159.2 following twice weekly i.p. administration of 1.0mg antibody/mouse. No significant weight loss was observed in any of the groups of animals.

EXAMPLE 20

INHIBITION OF TUMOR CELL GROWTH IN HUMAN PATIENTS

[0228] A group of human cancer patients diagnosed with pancreatic cancer is randomized into treatment groups. Each patient group is treated with weekly intravenous injections of mAb 7.159.2, 7.34.1 or 7.251.3 described herein. Each patient is dosed with an effective amount of the antibody ranging from 50 mg/kg to 2,250 mg/kg for 4-8 weeks. A control group is given only the standard chemotherapeutic regimen.

[0229] At periodic times during and after the treatment regimen, tumor burden is assessed by magnetic resonance imaging (MRI). It is found that the patients who have received weekly antibody treatment with mAb 7.159.2, 7.34.1 or 7.251.3 show significant reductions in tumor size, compared to patients that do not receive antibody treatment. In some treated patients, the tumors are no longer detectable. In contrast, tumor size increases or remains substantially the same in the control group.

EXAMPLE 21

INHIBITION OF TUMOR CELL GROWTH IN A HUMAN PATIENT

[0230] A human patient is diagnosed with a malignant tumor. The patient is treated with weekly intravenous injections of mAb 7.159.2 for 8 weeks. At periodic times during and after the treatment regimen, tumor burden is assessed by magnetic resonance imaging (MRI). Significant reductions in tumor size are found.

EXAMPLE 22

TREATMENT OF ACROMEGALY IN A HUMAN PATIENT

[0231] An adult male is diagnosed with acromegaly. The patient is treated with bi-weekly intravenous injections of mAb 7.34.1 over a period of 2 years. As a result, the patient experiences a significant reduction in the symptoms of acromegaly.

EXAMPLE 23

TREATMENT OF PSORIASIS IN A HUMAN PATIENT

[0232] An adult female is diagnosed with severe psoriasis. The patient is treated with bi-weekly intravenous injections of mAb 7.251.3 over a period of 3 weeks. As a result, the patient experiences a significant reduction in the symptoms of psoriasis.

EXAMPLE 24

TREATMENT OF OSTEOPOROSIS IN A HUMAN PATIENT

[0233] An adult female is diagnosed with osteoporosis. The patient is treated with bi-weekly intravenous injections of mAb 7.159.2 over a period of a year. As a result, there is a significant reduction in loss of bone density.

EXAMPLE 25

TREATMENT OF ATHEROSCLEROSIS IN A HUMAN PATIENT

[0234] An adult male is diagnosed with atherosclerosis. The patient is treated with bi-weekly intravenous injections of mAb 7.34.1 over a period of a year. As a result, the patient experiences a reduction in the symptoms of atherosclerosis, such as angina pectoris.

EXAMPLE 26

TREATMENT OF RESTENOSIS IN A HUMAN PATIENT

[0235] An adult male receives angioplasty to relieve a blocked artery. Following the angioplasty procedure, the patient is treated with bi-weekly intravenous injections of mAb 7.251.3 over a period of a year. As a result, the patient does not experience restenosis of the treated artery.

EXAMPLE 27

TREATMENT OF DIABETES IN A HUMAN PATIENT

[0236] An adult female is diagnosed with diabetes. The patient is treated with bi-weekly intravenous injections of mAb 7.159.2 over a period of a year. As a result, the symptoms of diabetes are reduced.

SEQUENCES

[0237] The sub-cloned hybridomas were sequenced to determine their primary structure at both the nucleotide and amino acid level for both the variable heavy and the variable light chain genes. The nucleotide and polypeptide sequences of the variable regions of the monoclonal antibodies against IGF-I and IGF-II, as listed in Table 1, are provided in the Sequence Listing.

INCORPORATION BY REFERENCE

[0238] All references cited herein, including patents, patent applications, papers, text books, and the like, and the references cited therein, to the extent that they are not already, are hereby incorporated herein by reference in their entirety.

EQUIVALENTS

[0239] The foregoing written specification is considered to be sufficient to enable one skilled in the art to practice the invention. The foregoing description and Examples detail certain preferred embodiments of the invention and describes the best mode contemplated by the inventors. It will be appreciated, however, that no matter how detailed the foregoing may appear in text, the invention may be practiced in many ways and the invention should be construed in accordance with the appended claims and any equivalents thereof.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A fully human isolated specific binding protein that preferentially binds to insulin-like growth factor-II (IGF-II) with cross-reactivity to insulin-like growth factor I (IGF-I) and neutralizes IGF-I and IGF-II activity.

2. The specific binding protein of Claim 1, wherein said binding protein binds to IGF-II with at least 2.5 times greater affinity than to IGF-I.

3. The specific binding protein of Claim 1, wherein said binding protein has an EC_{50} of no more than 15 nM for inhibiting IGF-I-dependent IGF-I receptor phosphorylation in NIH3T3 cells expressing IGF-1R ectopically.

4. The specific binding protein of Claim 1, wherein said binding protein has an EC_{50} of no more than 5 nM for inhibiting IGF-II-dependent IGF-I receptor phosphorylation in NIH3T3 cells expressing IGF-1R ectopically.

5. The specific binding protein of Claim 1, wherein said binding protein inhibits greater than 70% of IGF-II dependent proliferation of NIH3T3 cells that express recombinant hIGF-IR with an EC_{50} of no more than 25 nM.

6. The specific binding protein of Claim 1, wherein said binding protein inhibits greater than 70% of IGF-I dependent proliferation of NIH3T3 cells that express recombinant hIGF-IR with an EC_{50} of no more than 40 nM.

7. The specific binding protein of Claim 1, wherein said binding protein competes for binding with monoclonal antibody comprising a variable heavy chain sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO.: 2, SEQ ID NO.: 6, SEQ ID NO.: 10, SEQ ID NO.: 14 and SEQ ID NO.: 18.

8. The specific binding protein of Claim 7, wherein said monoclonal antibody comprises a variable light chain sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO.: 4, SEQ ID NO.: 8, SEQ ID NO.: 12 and SEQ ID NO.: 16.

9. The specific binding protein of any of Claims 1-8, wherein said binding protein binds to IGF-I with a K_D of less than 4 nM.

10. The specific binding protein of any of Claims 1-8, wherein said binding protein binds to IGF-I with a K_D of less than 650 pM.

11. The specific binding protein of any of Claims 1-8, wherein said binding protein binds to IGF-II with a K_D of less than 300 pM.

12. The specific binding protein of any of Claims 1-8, wherein said binding protein is a fully human monoclonal antibody.

13. The specific binding protein of any of Claims 1-8, wherein said binding protein is a binding fragment of a fully human monoclonal antibody.

14. The specific binding protein of Claim 13, wherein said binding fragment is selected from the group consisting of Fab, Fab' or $F(ab')_2$ and Fv.

15. The specific binding protein of any of Claims 1-8, wherein said binding protein is monoclonal antibody 7.251.3 (ATCC Accession Number PTA-7422).

16. The specific binding protein of any of Claims 1-8, wherein said binding protein is monoclonal antibody 7.34.1 (ATCC Accession Number PTA-7423).

17. The specific binding protein of any of Claims 1-8, wherein said binding protein is monoclonal antibody 7.159.2 (ATCC Accession Number PTA-7424).

18. The specific binding protein of any of Claims 1-8, wherein said binding protein comprises a heavy chain polypeptide having the sequence of SEQ ID NO.: 6.

19. The specific binding protein of any of Claims 1-8, wherein said binding protein comprises a light chain polypeptide having the sequence of SEQ ID NO.: 8.

20. The specific binding protein of any of Claims 1-8, wherein said binding protein comprises a heavy chain polypeptide having the sequence of SEQ ID NO.: 10.

21. The specific binding protein of any of Claims 1-8, wherein said binding protein comprises a light chain polypeptide having the sequence of SEQ ID NO.: 12.

22. The specific binding protein of any of Claims 1-8, wherein said binding protein comprises a heavy chain polypeptide having the sequence of SEQ ID NO.: 14.

23. The specific binding protein of any of Claims 1-8, wherein said binding protein comprises a light chain polypeptide having the sequence of SEQ ID NO.: 16.

24. The specific binding protein of any of Claims 1-8 in a mixture with a pharmaceutically acceptable carrier.

25. A nucleic acid molecule encoding the specific binding protein of Claim 1.

26. A vector comprising the nucleic acid molecule of Claim 25.

27. A host cell comprising the vector of Claim 26.

28. The human monoclonal antibody of Claim 12, wherein said antibody does not bind specifically to IGF-II or IGF-I proteins when said proteins are bound to Insulin Growth Factor Binding Proteins.

29. A method of determining the level of insulin-like growth factor-II (IGF-II) and insulin-like growth factor I (IGF-I) in a patient sample comprising:

providing a patient sample;

contacting said sample with the binding protein of Claim 1; and

determining the level of IGF-I and IGF-II in said sample.

30. The method according to Claim 29 wherein the patient sample is blood.

31. Use of the specific binding protein of any one of Claims 1-8 in the preparation of a medicament for the treatment of a malignant tumor.

32. The use of Claim 31, where said binding protein is a fully human monoclonal antibody.

33. The use of Claim 31, wherein said malignant tumor is selected from the group consisting of: melanoma, non-small cell lung cancer, glioma, hepatocellular (liver) carcinoma, thyroid tumor, gastric (stomach) cancer, prostrate cancer, breast cancer, ovarian cancer, bladder cancer, lung cancer, glioblastoma, endometrial cancer, kidney cancer, colon cancer, pancreatic cancer, and epidermoid carcinoma.

34. The use of Claim 32, wherein the binding protein is mAb 7.251.3 (ATCC Accession Number PTA-7422) or mAb 7.34.1 (ATCC Accession Number PTA-7423) or mAb 7.159.2 (ATCC Accession Number PTA-7424).

35. The use of Claim 31, wherein said medicament is for use in combination with a second anti-neoplastic agent selected from the group consisting of an antibody, a chemotherapeutic agent, and a radioactive drug.

36. The use of Claim 31, wherein said medicament is for use in conjunction with or following a conventional surgery, a bone marrow stem cell transplantation or a peripheral stem cell transplantation.

37. Use of the specific binding protein of any one of Claims 1-8 in the preparation of a medicament for the treatment of a growth factor-dependent disease.

38. The use of Claim 37, wherein said binding protein is a fully human monoclonal antibody.

39. The use of Claim 38, wherein the antibody is selected from the group consisting of mAb 7.251.3 (ATCC Accession Number PTA-7422), mAb 7.34.1 (ATCC Accession Number PTA-7423), and mAb 7.159.2 (ATCC Accession Number PTA-7424).

40. The use of Claim 37, wherein the growth factor-dependent disease is selected from the group consisting of: osteoporosis, diabetes, and cardiovascular diseases.

41. A method of treating a malignant tumor in a mammal, comprising:

selecting a mammal in need of treatment for a malignant tumor; and

administering to said mammal a therapeutically effective dose of the specific binding protein of Claim 1.

42. The method of Claim 41, wherein said animal is human.

43. The method of Claim 41, where said binding protein is a fully human monoclonal antibody.

44. The method of Claim 41, wherein said malignant tumor is selected from the group consisting of: melanoma, non-small cell lung cancer, glioma, hepatocellular (liver) carcinoma, thyroid tumor, gastric (stomach) cancer, prostrate cancer, breast cancer, ovarian cancer, bladder cancer, lung cancer, glioblastoma, endometrial cancer, kidney cancer, colon cancer, pancreatic cancer, and epidermoid carcinoma.

45. The method of Claim 41, wherein the binding protein is selected from the group consisting of mAb 7.251.3 (ATCC Accession Number PTA-7422), mAb 7.34.1 (ATCC Accession Number PTA-7423), and mAb 7.159.2 (ATCC Accession Number PTA-7424).

46. A method of treating a growth factor-dependent disease in a mammal, comprising:

selecting a mammal in need of treatment for a growth factor-dependent disease; and

administering to said mammal a therapeutically effective dose of the specific binding protein of Claim 1.

47. The method of Claim 46, wherein said mammal is human.

48. The method of Claim 46, wherein said binding protein is a fully human monoclonal antibody.

49. The method of Claim 46, wherein the antibody is selected from the group consisting of mAb 7.251.3 (ATCC Accession Number PTA-7422), mAb 7.34.1 (ATCC Accession Number PTA-7423), and mAb 7.159.2 (ATCC Accession Number PTA-7424).

50. The method of Claim 46, wherein the growth factor-dependent disease is selected from the group consisting of: osteoporosis, diabetes, and cardiovascular diseases.

51. A conjugate comprising the antibody of Claim 12 or a binding fragment thereof and a therapeutic agent.

52. The conjugate of Claim 51, wherein the therapeutic agent is a toxin.

53. The conjugate of Claim 51, wherein the therapeutic agent is a radioisotope.

54. The conjugate of Claim 51, wherein the therapeutic agent is a pharmaceutical composition.

55. The specific binding protein of any of Claims 1-8, wherein said binding protein, or binding fragment thereof, comprises:

a heavy chain complementarity determining region 1 (CDR1) having the amino acid sequence of "Ser Tyr Tyr Trp Ser" (SEQ ID NO: 21);

a heavy chain complementarity determining region 2 (CDR2) having the amino acid sequence of "Tyr Phe Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser" (SEQ ID NO: 22);

a heavy chain complementarity determining region 3 (CDR3) having the amino acid sequence of "Ile Thr Gly Thr Thr Lys Gly Gly Met Asp Val" (SEQ ID NO: 23);

a light chain complementarity determining region 1 (CDR1) having the amino acid sequence of "Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His" (SEQ ID NO: 24);

a light chain complementarity determining region 2 (CDR2) having the amino acid sequence of "Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser" (SEQ ID NO: 25); and

a light chain complementarity determining region 3 (CDR3) having the amino acid sequence of "Gln Ser Phe Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val" (SEQ ID NO: 26).

56. The specific binding protein of any of Claims 1-8, wherein said binding protein, or binding fragment thereof, comprises:

a heavy chain complementarity determining region 1 (CDR1) having the amino acid sequence of "Ser Tyr Tyr Trp Ser" (SEQ ID NO: 27);

a heavy chain complementarity determining region 2 (CDR2) having the amino acid sequence of "Tyr Phe Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser" (SEQ ID NO: 28);

a heavy chain complementarity determining region 3 (CDR3) having the amino acid sequence of "Ile Thr Gly Thr Thr Lys Gly Gly Met Asp Val" (SEQ ID NO: 29);

a light chain complementarity determining region 1 (CDR1) having the amino acid sequence of "Thr Gly Arg Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His" (SEQ ID NO: 30);

a light chain complementarity determining region 2 (CDR2) having the amino acid sequence of "Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser" (SEQ ID NO: 31); and

a light chain complementarity determining region 3 (CDR3) having the amino acid sequence of "Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val" (SEQ ID NO: 32).

57. The specific binding protein of any of Claims 1-8, wherein said binding protein, or binding fragment thereof, comprises:

a heavy chain complementarity determining region 1 (CDR1) having the amino acid sequence of "Ser Tyr Asp Ile Asn" (SEQ ID NO: 33);

a heavy chain complementarity determining region 2 (CDR2) having the amino acid sequence of "Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly" (SEQ ID NO: 34);

a heavy chain complementarity determining region 3 (CDR3) having the amino acid sequence of "Asp Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val" (SEQ ID NO: 35);

a light chain complementarity determining region 1 (CDR1) having the amino acid sequence of "Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Glu Asn Asn His Val Ser" (SEQ ID NO: 36);

a light chain complementarity determining region 2 (CDR2) having the amino acid sequence of "Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser" (SEQ ID NO: 37); and

a light chain complementarity determining region 3 (CDR3) having the amino acid sequence of "Glu Thr Trp Asp Thr Ser Leu Ser Ala Gly Arg Val" (SEQ ID NO: 38).

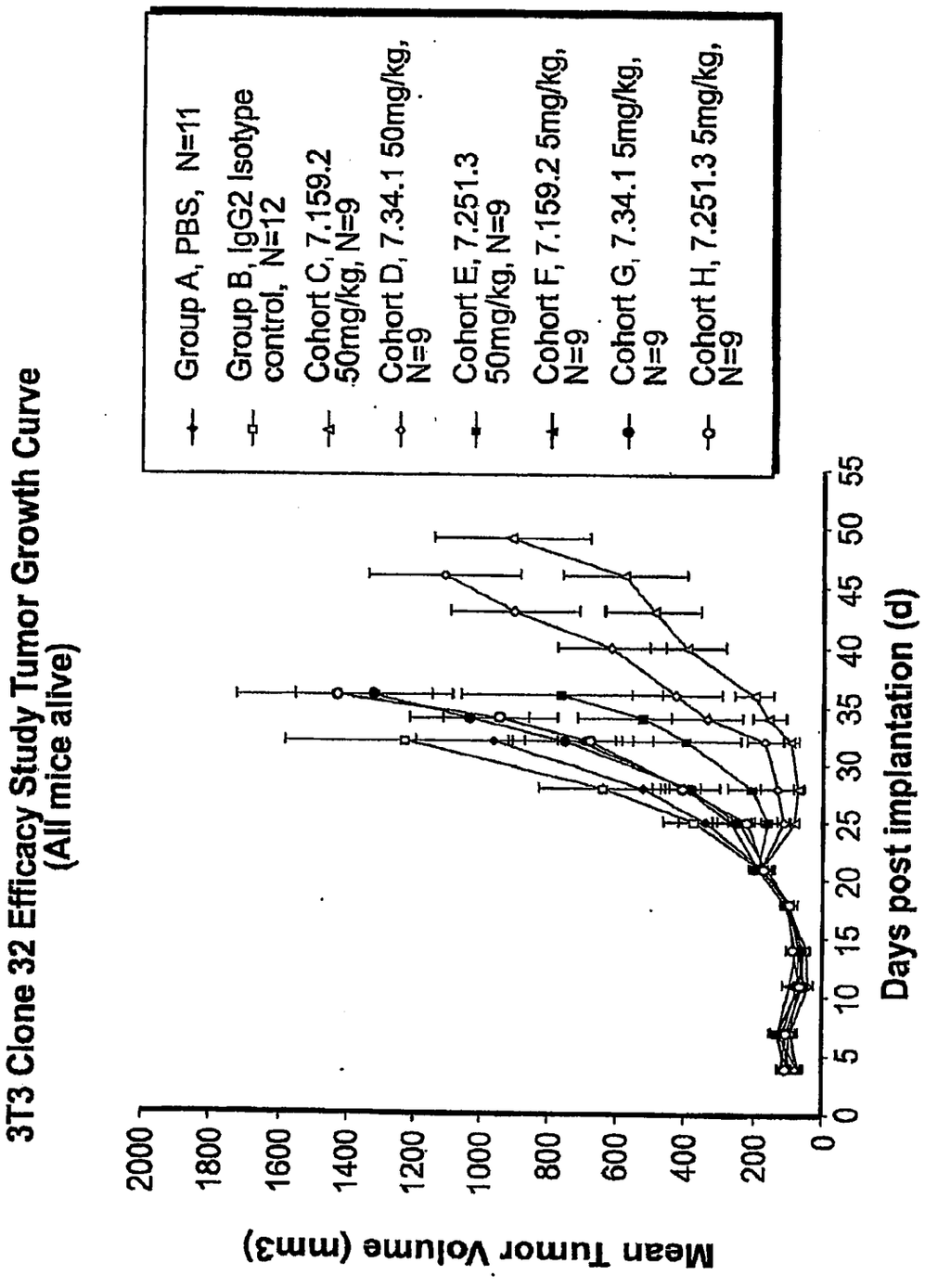

3T3 Clone 32 Efficacy Study Tumor Growth Curve
(All mice alive)
Mean Tumor Volume (mm3)
Days post implantation (d)
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
2000
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
Group A, PBS, N=11
Group B, IgG2 Isotype control, N=12
Cohort C, 7.159.2 50mg/kg, N=9
Cohort D, 7.34.1 50mg/kg, N=9
Cohort E, 7.251.3 50mg/kg, N=9
Cohort F, 7.159.2 5mg/kg, N=9
Cohort G, 7.34.1 5mg/kg, N=9
Cohort H, 7.251.3 5mg/kg, N=9

FIG. 1

3T3 Clone 32 Efficacy Study Body Weight Curve
Mean Body Weight (g)
35
30
25
20
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55
Days post implantation (d)
Group A, PBS, N=11
Group B, IgG2 Isotype control, N=12
Cohort C, 7.159.2 50mg/kg, N=9
Cohort D, 7.34.1 50mg/kg, N=9
Cohort E, 7.251.3 50mg/kg, N=9
Cohort F, 7.159.2 5mg/kg, N=9
Cohort G, 7.34.1 5mg/kg, N=9
Cohort H, 7.251.3 5mg/kg, N=9

FIG. 2

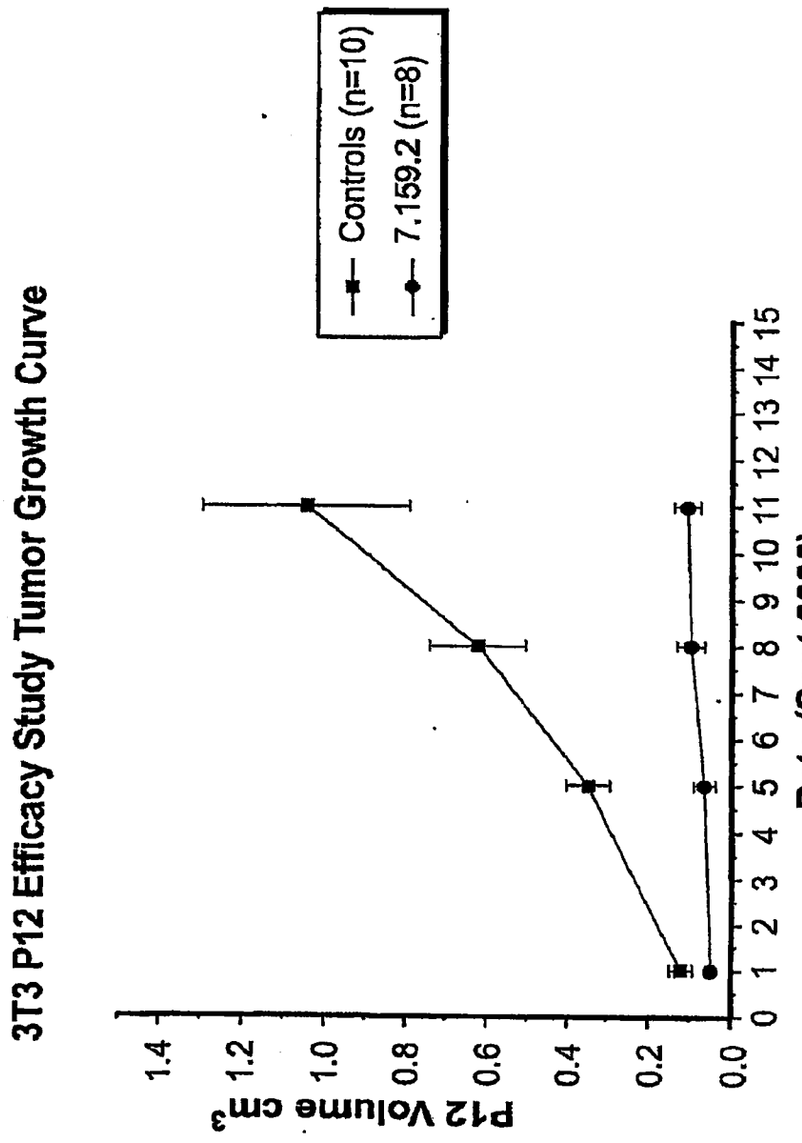

3T3 P12 Efficacy Study Tumor Growth Curve
Controls (n=10)
7.159.2 (n=8)
P12 Volume cm3
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Date (Sept 2006)

FIG. 3

ABXAZ 004VPC (2).TXT

SEQUENCE LISTING

<110> Raeber, Olivia
Gazit-Bornstein, Gadi
Yang, Xiaodong
Cartlidge, Susan Ann
Tonge, David William

<120> BINDING PROTEINS SPECIFIC FOR
INSULIN-LIKE GROWTH FACTORS AND USES THEREOF

<130> ABXAZ.004VPC

<160> 102

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 372
<212> DNA
<213> Human

<400> 1
cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagg agtagtagtt actactgggg ctggatccgc 120
cagccccag ggaaggggct ggagtggatt gggggtatct attatagtgg gagcacctac 180
tacaacccgt ctctcaagag tcgagtcacc atgtccgtag acacgtccaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgagctccgt gaccgccgca gacacggctg tgtattactg tgcgagacaa 300
aggggtcata gcagtggctg gtggtacttc gatctctggg gccgtggcac cctggtcact 360
gtctcctcag cc 372

<210> 2
<211> 124
<212> PRT
<213> Human

<400> 2
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Ser Ser
20 25 30
Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Gly Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Gln Arg Gly His Ser Ser Gly Trp Trp Tyr Phe Asp Leu
100 105 110
Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 3
<211> 324
<212> DNA
<213> Human

<400> 3
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagtgtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca gggtattagc agctacttag cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcaatggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacaatt tcccattcac tttcggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa acga 324

<210> 4
<211> 108
<212> PRT
<213> Human

<400> 4
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Asn Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Asn Phe Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
100 105

<210> 5
<211> 363
<212> DNA
<213> Human

<400> 5
caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc agttatgata tcaactgggt gcgacaggcc 120
actggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atgaacccta acagtggtaa cacaggctat 180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accaggaaca cctccataag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagaccct 300
tactactact actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360
gcc 363

<210> 6
<211> 121
<212> PRT
<213> Human

<400> 6
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 7
<211> 336
<212> DNA
<213> Human

<400> 7
cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtc tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
tcctgctctg gaagcagctc caacattgag aataatcatg tatcctggta ccagcagctc 120
ccaggaacag cccccaaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
actggggacg aggccgatta ttactgcgaa acatgggata ccagcctgag tgctggccgg 300
gtattcggcg gagggaccaa gctgaccgtc ctaggt 336

<210> 8
<211> 112
<212> PRT
<213> Human

<400> 8
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Glu Asn Asn
20 25 30
His Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80
Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu Thr Trp Asp Thr Ser Leu
85 90 95
Ser Ala Gly Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 9
<211> 360
<212> DNA
<213> Human

<400> 9
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 120
ccagggaggg gactggagtg gattggctat ttcttttaca gtgggtacac caactacaac 180
ccctccctca agagtcgcgt caccatgtca gttgacacgt ccaagaacca gttctctctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgtg tataactgga 300
acgacgaagg ggggtatgga cgtctggggc caaggggcca cggtcaccgt ctcctcagcc 360

<210> 10
<211> 120
<212> PRT
<213> Human

<400> 10
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Phe Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Cys Ile Thr Gly Thr Thr Lys Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Ala Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 11
<211> 336
<212> DNA
<213> Human

<400> 11
cagtctgtgc tgacgcaggc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgcactg ggagaagttc caacatcggg gcaggttatg atgtacactg gtaccagcag 120
tttccaggaa cagcccccaa actcctcatc tatggtaaca gcaatcggcc ctcaggggtc 180
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
caggctgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagtct gagtggttcg 300
gtattcggcg gagggaccaa gctgaccgtc ctaggt 336

<210> 12
<211> 112
<212> PRT
<213> Human

<400> 12
Gln Ser Val Leu Thr Gln Ala Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Arg Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30
Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45
Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 13
<211> 360
<212> DNA
<213> Human

<400> 13
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 120
ccagggaagg gactggagtg gattgggtat ttcttttaca gtgggtacac caactacaac 180
ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgtg tataactgga 300
acgacgaagg ggggtatgga cgtctggggc caagggacca cggtcaccgt ctcctcagcc 360

<210> 14
<211> 120
<212> PRT
<213> Human

<400> 14
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Phe Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Cys Ile Thr Gly Thr Thr Lys Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly

100 105 110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 15
<211> 336
<212> DNA
<213> Human

<400> 15
cagtctgtac tgacgcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgcactg ggagcagctc caacatcggg gcaggttatg atgtacactg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagccccaa gctcctcatc tatggtaaca acaatcggcc ctcaggggtc 180
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
caggctgatg atgaggctga ttattactgc cagtcctttg acagcagtct gagtggttcg 300
gtattcggcg gagggaccaa gctgaccgtc ctaggt 336

<210> 16
<211> 112
<212> PRT
<213> Human

<400> 16
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30
Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45
Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Asp Ser Ser
85 90 95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 17
<211> 372
<212> DNA
<213> Human

<400> 17
cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcaac agtagtagta actactgggg ctggatccgc 120
cagccccag ggaagggact ggcgtggatt gggggcatct attatagtgg gagcacctac 180
tacaacccgt ccctcaggag tcgagtcacc atgtccgtag acacgtccaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgagctctgt gaccgccgca gacacggctg tatattactg tgcgagacaa 300
aggggtcata gcagtggctg gtggtacttc gatctctggg gccgtggcac cctggtcact 360
gtctcctcag cc 372

<210> 18
<211> 124
<212> PRT
<213> Human

<400> 18
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Ser Ser
20 25 30
Ser Asn Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Ala
35 40 45
Trp Ile Gly Gly Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Arg Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Gln Arg Gly His Ser Ser Gly Trp Trp Tyr Phe Asp Leu
100 105 110
Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 19
<211> 324
<212> DNA
<213> Human

<400> 19
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtcg gggtattagc agctggttag cctggtatca gcagagacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatact gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccattcac tttcggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa acga 324

<210> 20
<211> 108
<212> PRT
<213> Human

<400> 20
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Thr Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
100 105

<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> Human

<400> 21
Ser Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 22
<211> 16
<212> PRT
<213> Human

<400> 22
Tyr Phe Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 23
<211> 11
<212> PRT

<213> Human

<400> 23
Ile Thr Gly Thr Thr Lys Gly Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 24
<211> 14
<212> PRT
<213> Human

<400> 24
Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
1 5 10

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> Human

<400> 25
Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213> Human

<400> 26
Gln Ser Phe Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
1 5 10

<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> Human

<400> 27
Ser Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 28
<211> 16
<212> PRT
<213> Human

<400> 28
Tyr Phe Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> Human

<400> 29
Ile Thr Gly Thr Thr Lys Gly Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 30

<211> 14
<212> PRT
<213> Human

<400> 30
Thr Gly Arg Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
1 5 10

<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> Human

<400> 31
Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 32
<211> 11
<212> PRT
<213> Human

<400> 32
Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
1 5 10

<210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> Human

<400> 33
Ser Tyr Asp Ile Asn
1 5

<210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> Human

<400> 34
Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

<210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> Human

<400> 35
Asp Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 36
<211> 13
<212> PRT
<213> Human

<400> 36
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Glu Asn Asn His Val Ser

1 5 10

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> Human

<400> 37
Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 38
<211> 12
<212> PRT
<213> Human

<400> 38
Glu Thr Trp Asp Thr Ser Leu Ser Ala Gly Arg Val
1 5 10

<210> 39
<211> 594
<212> DNA
<213> Human

<400> 39
accatgaaac atctgtggtt cttcctcctg ctggtggcgg ctcccagatg ggtcctgtcc 60
cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 120
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagg agtagtagtt actactgggg ctggatccgc 180
cagccccag ggaaggggct ggagtggatt gggggtatct attatagtgg gagcacctac 240
tacaacccgt ctctcaagag tcgagtcacc atgtccgtag acacgtccaa gaaccagttc 300
tccctgaagc tgagctccgt gaccgccgca gacacggctg tgtattactg tgcgagacaa 360
aggggtcata gcagtggctg gtggtacttc gatctctggg gccgtggcac cctggtcact 420
gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttccccc tggcgccctg ctccaggagc 480
acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 540
acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc agcggcgtgc acaccttccc agct 594

<210> 40
<211> 198
<212> PRT
<213> Human

<400> 40
Thr Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg
1 5 10 15
Trp Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
20 25 30
Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser
35 40 45
Ile Arg Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
50 55 60
Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser
85 90 95
Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr
100 105 110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Arg Gly His Ser Ser Gly Trp Trp
115 120 125
Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
130 135 140
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
145 150 155 160
Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
165 170 175

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
180 185 190
Val His Thr Phe Pro Ala
195

<210> 41
<211> 419
<212> DNA
<213> Human

<400> 41
atgagggtcc ctgctcagct cctggggctc ctgctgctct ggttcccagg ttccagatgc 60
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagtgtcacc 120
atcacttgtc gggcgagtca gggtattagc agctacttag cctggtatca gcagaaacca 180
gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 240
aggttcagcg gcaatggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 300
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacaatt tcccattcac tttcggccct 360
gggaccaaag tggatatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcc 419

<210> 42
<211> 139
<212> PRT
<213> Human

<400> 42
Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Phe Pro
1 5 10 15
Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser
20 25 30
Ala Ser Val Gly Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly
35 40 45
Ile Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
50 55 60
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80
Arg Phe Ser Gly Asn Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn
100 105 110
Asn Phe Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
115 120 125
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135

<210> 43
<211> 437
<212> DNA
<213> Human

<400> 43
accatggact ggacctggag gatcctcttc ttggtggcag cagctacaag tgcccactcc 60
caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 120
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc agttatgata tcaactgggt gcgacaggcc 180
actggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atgaacccta acagtggtaa cacaggctat 240
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accaggaaca cctccataag cacagcctac 300
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagaccct 360
tactactact actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 420
gcctccacca agggccc 437

<210> 44
<211> 145
<212> PRT
<213> Human

<400> 44
Thr Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr

```
 1               5                  10                  15
Ser Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
            20                  25                  30
Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
        35                  40                  45
Phe Thr Ser Tyr Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly
    50                  55                  60
Leu Glu Trp Met Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr
65                  70                  75                  80
Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile
                85                  90                  95
Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
            100                 105                 110
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
        115                 120                 125
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140
Gly
145
```

<210> 45
<211> 460
<212> DNA
<213> Human

<400> 45
atggcctggt ctcctctcct cctcaccctt ctcattcact gcacagggtc ctgggcccag 60
tctgtgttga cgcagccgcc ctcagtctct gcggccccag gacagaaggt caccatctcc 120
tgctctggaa gcagctccaa cattgagaat aatcatgtat cctggtacca gcagctccca 180
ggaacagccc ccaaactcct catttatgac aataataagc gaccctcagg gattcctgac 240
cgattctctg gctccaagtc tggcacgtca gccaccctgg gcatcaccgg actccagact 300
ggggacgagg ccgattatta ctgcgaaaca tgggatacca gcctgagtgc tggccgggta 360
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtcagccca aggctgcccc ctcggtcact 420
ctgttcccac cctcctctga ggagctccaa gccaacaagg 460

<210> 46
<211> 153
<212> PRT
<213> Human

<400> 46
```
Met Ala Trp Ser Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ile His Cys Thr Gly
 1               5                  10                  15
Ser Trp Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala
            20                  25                  30
Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile
        35                  40                  45
Glu Asn Asn His Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro
    50                  55                  60
Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp
65                  70                  75                  80
Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr
                85                  90                  95
Gly Leu Gln Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu Thr Trp Asp
            100                 105                 110
Thr Ser Leu Ser Ala Gly Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
        115                 120                 125
Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro
    130                 135                 140
Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys
145                 150
```

<210> 47
<211> 613
<212> DNA
<213> Human

<400> 47
accatgaaac atctgtggtt cttccttctc ctggtggcag ctcccagatg ggtcctgtcc 60
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 120
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 180
ccagggaggg gactggagtg gattggctat ttcttttaca gtgggtacac caactacaac 240
ccctccctca agagtcgcgt caccatgtca gttgacacgt ccaagaacca gttctctctg 300
aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgtg tataactgga 360
acgacgaagg ggggtatgga cgtctggggc caaggggcca cggtcaccgt ctcctcagcc 420
tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc 480
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540
aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtcctcagga 600
ctctactccc tca 613

<210> 48
<211> 204
<212> PRT
<213> Human

<400> 48
Thr Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg
1 5 10 15
Trp Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
20 25 30
Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser
35 40 45
Ile Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly
50 55 60
Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80
Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn
85 90 95
Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Cys Ile Thr Gly Thr Thr Lys Gly Gly Met Asp Val
115 120 125
Trp Gly Gln Gly Ala Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130 135 140
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
145 150 155 160
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
165 170 175
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
180 185 190
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
195 200

<210> 49
<211> 432
<212> DNA
<213> Human

<400> 49
cctctgctcc tcactctcct cgctcactgc acagggtcct gggcccagtc tgtgctgacg 60
caggcgccct cagtgtctgg ggccccaggg cagagggtca ccatctcctg cactgggaga 120
agttccaaca tcggggcagg ttatgatgta cactggtacc agcagtttcc aggaacagcc 180
cccaaactcc tcatctatgg taacagcaat cggccctcag gggtccctga ccgattctct 240
ggctccaagt ctggcacctc agcctccctg gccatcactg ggctccaggc tgaggatgag 300
gctgattatt actgccagtc ctatgacagc agtctgagtg gttcggtatt cggcggaggg 360
accaagctga ccgtcctagg tcagcccaag gctgcccccc cggtcactct gttcccgccc 420
tcctctgagg ag 432

<210> 50
<211> 144
<212> PRT
<213> Human

<400> 50
Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala His Cys Thr Gly Ser Trp Ala Gln
1 5 10 15
Ser Val Leu Thr Gln Ala Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg
20 25 30
Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Arg Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr
35 40 45
Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
50 55 60
Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
65 70 75 80
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
85 90 95
Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu
100 105 110
Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
115 120 125
Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
130 135 140

<210> 51
<211> 543
<212> DNA
<213> Human

<400> 51
atgaagcatc tgtggttctt ccttctcctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccct gtccctcacc 120
tgcactgtct ctggtggctc catcagtagt tactactgga gctggatccg gcagcccccа 180
gggaagggac tggagtggat tgggtatttc ttttacagtg ggtacaccaa ctacaacccc 240
tccctcaaga gtcgagtcac catatcagta gacacgtcca agaaccagtt ctccctgaag 300
ctgagctctg tgaccgctgc ggacacggcc gtgtattact gtgcgtgtat aactggaacg 360
acgaaggggg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcagcctcc 420
accaagggcc catcggtctt ccccctggcg ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca 480
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 540
tca 543

<210> 52
<211> 181
<212> PRT
<213> Human

<400> 52
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
35 40 45
Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro
65 70 75 80
Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95
Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys Ala Cys Ile Thr Gly Thr Thr Lys Gly Gly Met Asp Val Trp
115 120 125
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
130 135 140
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
145 150 155 160
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
165 170 175
Val Ser Trp Asn Ser
180

ABXAZ 004VPC (2).TXT

<210> 53
<211> 451
<212> DNA
<213> Human

<400> 53
tcctctgctc ctcactctcc tcgctcactg cacagggtcc tgggcccagt ctgtactgac 60
gcagccgccc tcagtgtctg gggccccagg gcagagggtc accatctcct gcactgggag 120
cagctccaac atcggggcag gttatgatgt acactggtac cagcagcttc caggaacagc 180
ccccaagctc ctcatctatg gtaacaacaa tcggccctca ggggtccctg accgattctc 240
tggctccaag tctggcacct cagcctccct ggccatcact gggctccagg ctgatgatga 300
ggctgattat tactgccagt cctttgacag cagtctgagt ggttcggtat tcggcggagg 360
gaccaagctg accgtcctag gtcagcccaa ggctgccccc tcggtcactc tgttcccgcc 420
ctcctctgag gagctccaag ccaacaagga a 451

<210> 54
<211> 145
<212> PRT
<213> Human

<400> 54
Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala His Cys Thr Gly Ser Trp Ala Gln
1 5 10 15
Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg
20 25 30
Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr
35 40 45
Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
50 55 60
Ile Tyr Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
65 70 75 80
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
85 90 95
Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Asp Ser Ser Leu
100 105 110
Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
115 120 125
Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
130 135 140
Leu
145

<210> 55
<211> 559
<212> DNA
<213> Human

<400> 55
accatgaaac atctgtggtt cttcctcctg ctggtggcgg ctcccagatg ggtcctgtcc 60
cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 120
acctgcactg tctctggtgg ctccatcaac agtagtagta actactgggg ctggatccgc 180
cagccccag ggaagggact ggcgtggatt gggggcatct attatagtgg gagcacctac 240
tacaacccgt ccctcaggag tcgagtcacc atgtccgtag acacgtccaa gaaccagttc 300
tccctgaagc tgagctctgt gaccgccgca gacacggctg tatattactg tgcgagacaa 360
aggggtcata gcagtggctg gtggtacttc gatctctggg gccgtggcac cctggtcact 420
gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttccccc tggcgccctg ctccaggagc 480
acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 540
acggtgtcgt ggaactcag 559

<210> 56
<211> 186
<212> PRT
<213> Human

<400> 56

Thr Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg
1 5 10 15
Trp Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
20 25 30
Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser
35 40 45
Ile Asn Ser Ser Ser Asn Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
50 55 60
Lys Gly Leu Ala Trp Ile Gly Gly Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser
85 90 95
Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr
100 105 110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Arg Gly His Ser Ser Gly Trp Trp
115 120 125
Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
130 135 140
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
145 150 155 160
Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
165 170 175
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
180 185

<210> 57
<211> 532
<212> DNA
<213> Human

<400> 57
atgagggtcc ccgctcagct cctggggctc ctgctgctct ggttcccagg ttccagatgc 60
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 120
atcacttgtc gggcgagtcg gggtattagc agctggttag cctggtatca gcagagacca 180
gggaaagccc ctaagctcct gatctatact gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 240
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 300
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccattcac tttcggccct 360
gggaccaaag tggatatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 420
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg ta 532

<210> 58
<211> 177
<212> PRT
<213> Human

<400> 58
Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Phe Pro
1 5 10 15
Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser
20 25 30
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Gly
35 40 45
Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro
50 55 60
Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn
100 105 110
Ser Phe Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
115 120 125
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175
Gly

<210> 59
<211> 594
<212> DNA
<213> Human

<400> 59
accatgaaac atctgtggtt cttcctcctg ctggtggcgg ctcccagatg ggtcctgtcc 60
cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 120
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtagtagtt actactgggg ctggatccgc 180
cagccccag ggaaggggct ggagtggatt gggggtatct attatagtgg gagcacctac 240
tacaacccgt ctctcaagag tcgagtcatc atgtccgtag acacgtccaa gaaccagttc 300
tccctgaagc tgagctccgt gaccgccgca gacacggctg tgtattactg tgcgagacaa 360
aggggtcata gcagtggctg gtggtacttc gatctctggg gccgtggcac cctggtcact 420
gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttccccc tggcgccctg ctccaggagc 480
acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 540
acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc agcggcgtgc acaccttccc agct 594

<210> 60
<211> 198
<212> PRT
<213> Human

<400> 60
Thr Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg
1 5 10 15
Trp Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
20 25 30
Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser
35 40 45
Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
50 55 60
Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser
85 90 95
Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr
100 105 110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Arg Gly His Ser Ser Gly Trp Trp
115 120 125
Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
130 135 140
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
145 150 155 160
Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
165 170 175
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
180 185 190
Val His Thr Phe Pro Ala
195

<210> 61
<211> 419
<212> DNA
<213> Human

<400> 61
atgagggtcc ctgctcagct cctggggctc ctgctgctct ggttcccagg ttccagatgc 60
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 120
atcacttgtc gggcgagtca gggtattagc agctacttag cctggtatca gcagaaacca 180
gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 240
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 300

gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacaatt tcccattcac tttcggccct 360
gggaccaaag tggatatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcc 419

<210> 62
<211> 139
<212> PRT
<213> Human

<400> 62
Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Phe Pro
1 5 10 15
Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser
20 25 30
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly
35 40 45
Ile Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
50 55 60
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn
100 105 110
Asn Phe Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
115 120 125
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135

<210> 63
<211> 437
<212> DNA
<213> Human

<400> 63
accatggact ggacctggag gatcctcttc ttggtggcag cagctacaag tgcccactcc 60
caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 120
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc agttatgata tcaactgggt gcgacaggcc 180
actggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atgaacccta acagtggtaa cacaggctat 240
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaca cctccataag cacagcctac 300
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagaccct 360
tactactact actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 420
gcctccacca agggccc 437

<210> 64
<211> 145
<212> PRT
<213> Human

<400> 64
Thr Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr
1 5 10 15
Ser Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
20 25 30
Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
35 40 45
Phe Thr Ser Tyr Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly
50 55 60
Leu Glu Trp Met Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr
65 70 75 80
Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile
85 90 95
Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
100 105 110
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
115 120 125
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140

Gly
145

<210> 65
<211> 460
<212> DNA
<213> Human

<400> 65
atggcctggt ctcctctcct cctcaccctt ctcattcact gcacagggtc ctgggcccag 60
tctgtgttga cgcagccgcc ctcagtctct gcggccccag gacagaaggt caccatctcc 120
tgctctggaa gcagctccaa cattgagaat aatcatgtat cctggtacca gcagctccca 180
ggaacagccc ccaaactcct catttatgac aataataagc gaccctcagg gattcctgac 240
cgattctctg gctccaagtc tggcacgtca gccaccctgg gcatcaccgg actccagact 300
ggggacgagg ccgattatta ctgcgaaaca tgggatacca gcctgagtgc tggccgggta 360
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtcagccca aggctgcccc ctcggtcact 420
ctgttcccac cctcctctga ggagctccaa gccaacaagg 460

<210> 66
<211> 153
<212> PRT
<213> Human

<400> 66
Met Ala Trp Ser Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ile His Cys Thr Gly
 1   5   10   15
Ser Trp Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala
            20   25   30
Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile
        35   40   45
Glu Asn Asn His Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro
    50   55   60
Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp
65   70   75   80
Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr
                85   90   95
Gly Leu Gln Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu Thr Trp Asp
            100   105   110
Thr Ser Leu Ser Ala Gly Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
        115   120   125
Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro
    130   135   140
Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys
145   150

<210> 67
<211> 613
<212> DNA
<213> Human

<400> 67
accatgaaac atctgtggtt cttccttctc ctggtggcag ctcccagatg ggtcctgtcc 60
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 120
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 180
ccagggaagg gactggagtg gattggctat ttctttttaca gtgggtacac caactacaac 240
ccctccctca agagtcgcgt caccatctca gttgacacgt ccaagaacca gttctctctg 300
aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgcg tataactgga 360
acgacgaagg ggggtatgga cgtctggggc caagggacca cggtcaccgt ctcctcagcc 420
tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc 480
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540
aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtcctcagga 600
ctctactccc tca 613

<210> 68
<211> 204
<212> PRT

<213> Human

<400> 68

```
Thr Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg
 1               5                  10                  15
Trp Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
            20                  25                  30
Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser
        35                  40                  45
Ile Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly
    50                  55                  60
Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn
65                  70                  75                  80
Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn
                85                  90                  95
Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
            100                 105                 110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Thr Gly Thr Thr Lys Gly Gly Met Asp Val
        115                 120                 125
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
    130                 135                 140
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
145                 150                 155                 160
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
                165                 170                 175
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
            180                 185                 190
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
        195                 200
```

<210> 69
<211> 432
<212> DNA
<213> Human

<400> 69

```
cctctgctcc tcactctcct cgctcactgc acagggtcct gggcccagtc tgtgctgacg 60
cagccgccct cagtgtctgg ggccccaggg cagagggtca ccatctcctg cactgggaga 120
agttccaaca tcggggcagg ttatgatgta cactggtacc agcagttgcc aggaacagcc 180
cccaaactcc tcatctatgg taacagcaat cggccctcag gggtccctga ccgattctct 240
ggctccaagt ctggcacctc agcctccctg gccatcactg ggctccaggc tgaggatgag 300
gctgattatt actgccagtc ctatgacagc agtctgagtg gttcggtatt cggcggaggg 360
accaagctga ccgtcctagg tcagcccaag gctgcccccc cggtcactct gttcccgccc 420
tcctctgagg ag                                                     432
```

<210> 70
<211> 144
<212> PRT
<213> Human

<400> 70

```
Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala His Cys Thr Gly Ser Trp Ala Gln
 1               5                  10                  15
Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg
            20                  25                  30
Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Arg Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr
        35                  40                  45
Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
    50                  55                  60
Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
65                  70                  75                  80
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
                85                  90                  95
Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu
            100                 105                 110
Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
        115                 120                 125
```

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
130 135 140

<210> 71
<211> 543
<212> DNA
<213> Human

<400> 71
atgaagcatc tgtggttctt ccttctcctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccct gtccctcacc 120
tgcactgtct ctggtggctc catcagtagt tactactgga gctggatccg gcagccccca 180
gggaagggac tggagtggat tgggtatttc ttttacagtg ggtacaccaa ctacaacccc 240
tccctcaaga gtcgagtcac catatcagta gacacgtcca agaaccagtt ctccctgaag 300
ctgagctctg tgaccgctgc ggacacggcc gtgtattact gtgcgcgtat aactggaacg 360
acgaaggggg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcagcctcc 420
accaagggcc catcggtctt ccccctggcg ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca 480
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 540
tca 543

<210> 72
<211> 181
<212> PRT
<213> Human

<400> 72
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
35 40 45
Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro
65 70 75 80
Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95
Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys Ala Arg Ile Thr Gly Thr Thr Lys Gly Gly Met Asp Val Trp
115 120 125
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
130 135 140
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
145 150 155 160
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
165 170 175
Val Ser Trp Asn Ser
180

<210> 73
<211> 451
<212> DNA
<213> Human

<400> 73
tcctctgctc ctcactctcc tcgctcactg cacagggtcc tgggcccagt ctgtactgac 60
gcagccgccc tcagtgtctg gggccccagg gcagagggtc accatctcct gcactgggag 120
cagctccaac atcggggcag gttatgatgt acactggtac cagcagcttc caggaacagc 180
ccccaagctc ctcatctatg gtaacaacaa tcggccctca ggggtccctg accgattctc 240
tggctccaag tctggcacct cagcctccct ggccatcact gggctccagg ctgaagatga 300
ggctgattat tactgccagt cctttgacag cagtctgagt ggttcggtat tcggcggagg 360
gaccaagctg accgtcctag gtcagcccaa ggctgccccc tcggtcactc tgttcccgcc 420
ctcctctgag gagctccaag ccaacaagga a 451

<210> 74
<211> 145
<212> PRT
<213> Human

<400> 74
Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala His Cys Thr Gly Ser Trp Ala Gln
1 5 10 15
Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg
20 25 30
Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr
35 40 45
Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
50 55 60
Ile Tyr Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
65 70 75 80
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
85 90 95
Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Asp Ser Ser Leu
100 105 110
Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
115 120 125
Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
130 135 140
Leu
145

<210> 75
<211> 119
<212> PRT
<213> Human

<400> 75
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
115

<210> 76
<211> 110
<212> PRT
<213> Human

<400> 76
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30
Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95
Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 77
<211> 118
<212> PRT
<213> Human

<400> 77
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30
Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Ser Ser Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala
115

<210> 78
<211> 108
<212> PRT
<213> Human

<400> 78
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
100 105

<210> 79
<211> 117
<212> PRT
<213> Human

<400> 79
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Ile Thr Gly Thr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser Ala
115

<210> 80
<211> 112
<212> PRT
<213> Human

<400> 80
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30
Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45
Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 81
<211> 7
<212> PRT
<213> Human

<400> 81
Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 82
<211> 16
<212> PRT
<213> Human

<400> 82
Gly Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 83
<211> 13
<212> PRT
<213> Human

<400> 83
Gln Arg Gly His Ser Ser Gly Trp Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 84
<211> 11
<212> PRT
<213> Human

<400> 84
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 85
<211> 7
<212> PRT
<213> Human

<400> 85
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 86
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 86
Gln Gln Ala Asn Asn Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 87
<211> 7
<212> PRT
<213> Human

<400> 87
Ser Ser Ser Asn Tyr Trp Gly
1 5

<210> 88
<211> 16
<212> PRT
<213> Human

<400> 88
Gly Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser
1 5 10 15

<210> 89
<211> 13
<212> PRT
<213> Human

<400> 89
Gln Arg Gly His Ser Ser Gly Trp Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 90
<211> 11
<212> PRT
<213> Human

<400> 90
Arg Ala Ser Arg Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 91
<211> 7
<212> PRT
<213> Human

<400> 91

Thr Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 92
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 92
Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 93
<211> 25
<212> PRT
<213> Human

<400> 93
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 94
<211> 10
<212> PRT
<213> Human

<400> 94
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asp Ile Asn
1 5 10

<210> 95
<211> 25
<212> PRT
<213> Human

<400> 95
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 96
<211> 12
<212> PRT
<213> Human

<400> 96
Gly Gly Ser Ile Arg Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5 10

<210> 97
<211> 25
<212> PRT
<213> Human

<400> 97
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

ABXAZ 004VPC (2).TXT

<210> 98
<211> 12
<212> PRT
<213> Human

<400> 98
Gly Gly Ser Ile Asn Ser Ser Ser Asn Tyr Trp Gly
1 5 10

<210> 99
<211> 25
<212> PRT
<213> Human

<400> 99
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 100
<211> 10
<212> PRT
<213> Human

<400> 100
Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser
1 5 10

<210> 101
<211> 25
<212> PRT
<213> Human

<400> 101
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 102
<211> 10
<212> PRT
<213> Human

<400> 102
Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser
1 5 10

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

(43) Fecha de Publicación Internacional
21 de junio de 2007 (21.06.2007)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2007/070432 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes[7]:
A61K 39/395 (2006.01) *C12N 15/09 (2006.01)*
C07K 16/22 (2006.01)

(21) No. Solicitud Internacional: PCT/US2006/047059

(22) Fecha de Presentación Internacional:
8 de Diciembre de 2006 (08.12.2006)

(25) Idioma de Presentación: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Datos relativos a la Prioridad:

60/750,085	13 de diciembre de 2005 (13.12.2005) US
60/750,772	14 de diciembre de 2005 (14.12.2005) US
60/774,747	17 de Febrero de 2006 (17.02.2006) US
60/808,183	24 de mayo de 2006 (24.05.2006) US

(71) Solicitante *(para todos los países destinatarios con excepción de US)*: **AMGEN FREMONT INC.** [US/US]; 6701 Kaiser Drive, Fremont, California 94555 (US) **ASTRAZENECA AB** [-/SE]; Sodertalje, SE-151 85 (SE).

(72) Inventores, e
(75) Inventores/Solicitantes *(para US únicamente)*: **RAEBER, Olivia** [FR/US]; 990 Glennan Dr., Redwood City, California 94061 (US). **GAZIT-BORNSTEIN, Gadi** [US/US]; 10 Museum Way, #1526, Cambdrige, Massachusetts 02141 (US). **YANG, Xiaodong** [US/US]; 250 El Dorado Avenue, Palo Alto, California 94306 (US). **CARTLIDGE, Susan, Ann** [GB/GB]; Mereside, Alderly Park, Macclesfield Cheshire SK10 4TG (GB). **TONGE, David, William** [GB/GB]; Mereside, Alderly Park, Macclesfield Cheshire SK10 4TG (GB).

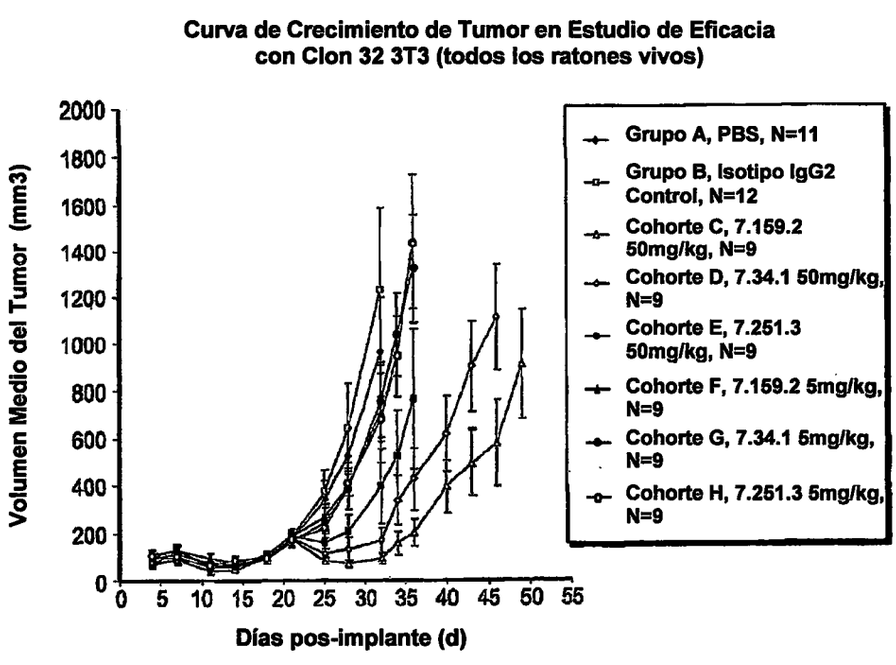
(74) Agente: **FULLER, Michael, L.**; Knobbe Martens Olson & Bear LLP, 2040 Main Street, Fourteenth Floor, Irvine, California 92614 (NUS).

(81) Países designados *(a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección 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, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Países designados *(a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Título: PROTEÍNAS DE UNIÓN ESPECÍFICAS DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO INSULINOIDES Y USOS DE LAS MISMAS



(57) Extracto: Se describen proteínas de unión, tales como anticuerpos dirigidos a IGF-II con reactividad cruzada a IGF-I, usos de tales anticuerpos. En particular, se divulgan anticuerpos monoclonales completamente humanos dirigidos a IGF-I. Se discuten igualmente secuencias de nucleótidos que codifican, y secuencias de aminoácidos que comprenden, moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera y pesada, particularmente secuencias que corresponden a secuencia de cadenas ligera y

WO 2007/070432 A3

BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, 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).

Declaraciones bajo la Regla 4.17:
— *de la condición de inventor (Regla 4.17(iv))*

Publicado:
— *con informe internacional de búsqueda*
— *antes del vencimiento del tiempo límite para modificar las reivindicaciones y para volverse a publicar en el caso de recibo de modificaciones.*

— Con el listado de secuencias, parte de la descripción se publica separadamente en formato electrónico y está disponible, previa solicitud, de la Oficina INternacional

(88) Fecha de publicación del informe de búsqueda internacional:

29 de Noviembre de 2007

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, remítase a las "Notas Guía sobre Códigos y Abreviaturas" que aparece al comienzo de cada edición regular del Boletín Oficial PCT.

PROTEÍNAS DE UNIÓN ESPECÍFICAS DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO INSULINOIDES Y USOS DE LAS MISMAS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud reivindica prioridad bajo 35 U.S.C. § 119 a la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Serial No. 60/750,085, presentada el 13 de diciembre, 2005; Solicitud Provisional de los Estados Unidos Serial No. 60/750,772, presentada el 14 de diciembre, 2005; Solicitud Provisional de los Estados Unidos Serial No. 60/774,747, presentada el 17 de febrero, 2005; y Solicitud Provisional de los Estados Unidos Serial No. 60/808,183, presentada el 24 de mayo, 2006, cada una de las cuales se incorpora en esta solicitud por referencia en su integridad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Campo de la Invención

[0002] La invención se refiere a proteínas de unión que se unen al factor 2 de crecimiento insulinoide (IGF-II) con reactividad cruzada al factor 1 de crecimiento insulinoide (IGF-I) y usos de tales proteínas de unión. Más específicamente, la invención se relaciona con anticuerpos monoclonales dirigidos contra IGF-II con reactividad cruzada a IGF-I y usos de estos anticuerpos. Aspectos de la invención conciernen además a hibridomas u otras líneas de células que expresan tales anticuerpos.

Descripción del Arte Relacionado

[0003] El factor I de crecimiento insulinoide IGF-I y IGF-II son polipéptidos pequeños implicados en regular la proliferación, supervivencia, diferenciación y transformación de las células. Los IGFs ejercen sus diferentes acciones interactuando principalmente con un receptor específico de superficie celular, el receptor IGF-I (IGF-IR) y activando varias cascadas de señalización intracelular. Los IGFs circulan en

el suero la mayoría de las veces ligados a proteínas de unión a IGF (IGFBP-1 a 6). La interacción de los IGFs con el IGF-IR se regula por las IGFBPs, y los IGFs pueden unirse únicamente al IGF-IR una vez liberado de las IGFBPs (en la mayoría de los casos mediante proteólisis de las IGFBPs). El IGF-I puede unirse asimismo a un receptor híbrido compuesto de subunidades de IGF-IR y receptor de insulina (IR). Se ha demostrado que el IGF-II se une a la isoforma "A" del receptor de insulina.

[0004] La transformación maligna implica el desequilibrio de diversos procesos tales como el crecimiento, diferenciación, apoptosis, y transformación de las células. El IGF-I y el IGF-II se han implicado en la patofisiología de una amplia gama de enfermedades, y se cree que juegan un papel en tumorigénesis, debido a las propiedades mitogénicas y antiapoptóticas mediadas por el receptor IGF-IR. LeRoith and Roberts, *Cancer Lett.* **195**:127-137 (2003).

[0005] El IGF-I se descubrió como un factor de crecimiento producido por el hígado bajo el control regulador de la hormona de crecimiento hipofisaria y se designó originalmente somatomedina-C. Salmon *et al., J. Lab. Clin. Med.* **49**:825-826 (1957). Los dos IGF-I e IGF-II se expresan de manera omnipresente y actúan como factores de crecimiento endocrinos, paracrinos, y autocrinos, a través de su interacción con el IGF-IR, una tirosina cinasa trans-membrana que se relaciona estructural y funcionalmente con el receptor de insulina (IR). El IGF-I funciona principalmente activando el IGF-IR, mientras que el IGF-II puede actuar o bien a través del IGF-IR o bien a través del la isoforma IR-A. LeRoith and Roberts, Cancer Lett. **195**:127-137 (2003). Adicionalmente, la interacción de ambos IGF-I e IGF-II con las proteínas de unión a IGF puede afectar la semivida y la biodisponibilidad de los IGFs, así como su interacción directa con receptores en algunos casos. Rajaram *et al., Endocr. Rev.* **18**:801-831 (1997).

[0006] El IGF-I tiene un impacto a largo plazo sobre la proliferación, diferenciación, y apoptosis de las células. Experimentos en células cultivadas de osteosarcoma y cáncer de mama sugirieron que el IGF-I es un

potente mitógeno y que ejerce su acción mitogénica aumentando la síntesis de ADN y estimulando la expresión de ciclina D1, la cual acelera la progresión del ciclo celular de la fase G_1 a S. Furlanetto *et al., Mol. Endocrinol.* **8**:510-517 (1994); Dufourny *et al., J. Biol. Chem.* **272**:311663-31171 (1997). La supresión de la expresión de la ciclina D1 en células cancerosas pancreáticas abolió el efecto mitogénico de IGF-I. Kornmann *et al., J. Clin. Invest.* **101**:344-352 (1998). Aparte de estimular la progresión del ciclo celular, el IGF-I inhibe además la apoptosis. Se ha demostrado que el IGF-I estimula la expresión de proteínas Bcl y que suprime la expresión de Bax, lo cual resulta en un aumento en la cantidad relativa del heterodímero Bcl/Bax, bloqueando en esa forma la iniciación de la vía apoptótica. Minshall *et al., J. Immunol.* **159**:1225-1232 (1997); Parrizas *et al., Endocrinology* **138**:1355-1358 (1997); Wang *et al., Endocrinology* **139**:1354-1360 (1998).

[0007] Al igual que IGF-I, el IGF-II posee también acciones mitogénicas y antiapoptóticas y regula la proliferación y la diferenciación de las células. Comparado con el IGF-I, concentraciones elevadas de IGF-II circulan en el suero. Concentraciones elevadas de IGF-II en el suero se han encontrado en pacientes con cáncer colorrectal, con una tendencia hacia concentraciones más elevadas en enfermedad avanzada. Renehan *et al., Br. J. Cancer* 83:1344-1350. Adicionalmente, la mayoría de los tumores primarios y líneas de células transformadas sobreexpresan ARNm IGF-II y proteína. Werner and LeRoith *Adv. Cancer Res.* **68**:183-223 (1996). La sobre-expresión de IGF-II en cáncer de colon se asocia con un fenotipo agresivo, y la pérdida de sellado (pérdida de expresión específica de alelos) del gen IGF-II pueden ser importantes en carcinogénesis colorrectal. Michell *et al., Br. J. Cancer* 76:60-66 (1997); Takano *et al., Oncology* **59**:210-216 (2000). Las células cancerosas con una fuerte tendencia a hacer metástasis tienen niveles cuatro veces más altos de expresión de IGF-II que aquellas células con una baja capacidad a hacer metástasis. Guerra *et al., Int. J. Cancer* **65**:812-820(1996).

[0008] La investigación y estudios clínicos han destacado el papel de

los miembros de la familia IGF en el desarrollo, mantenimiento y evolución del cáncer. Se ha demostrado que muchas células cancerosas sobre-expresan los ligandos IGF-IR y/o IGF. Por ejemplo, IGF-I e IGF-II son fuertes mitógenos para una amplia variedad de líneas de células cancerosas, incluidas sarcoma, leucemia, y neoplasias malignas (***"cancers"***) de la próstata, mama, pulmón, colon, estómago, esófago, hígado, páncreas, riñón, tiroides, cerebro, ovarios, y útero. Macaulay *et al., Br. J. Cancer* **65**:311-320 (1992); Oku *et al., Anticancer Res.* **11**:1591-1595 (1991); LeRoith *et al., Ann. Intern. Med.* 122:54-59 (1995); Yaginuma *et al., Oncology* **54**:502-507 (1997); Singh *et al., Endocrinology* 137:1764-1774 (1996); Frostad *et al., Eur. J. Haematol* **62**:191-198 (1999). Cuando el IGF-I se administró a células de cáncer de colon maligno, se volvieron resistentes a la apoptosis inducidas por citocinas. Remacle-Bonnet *et al., Cancer Res.* 60:2007-2017 (2000).

[0009] El papel de los IGFs en cáncer se ve también sustentado por estudios epidemiológicos, los cuales demostraron que niveles elevados de IGF-I en circulación y bajos niveles de IGFBP-3 se asocian con un riesgo cada vez mayor para el desarrollo de varias neoplasias malignas comunes (próstata, mama, colorrectal y pulmón). Mantzoros *et al., Br. J. Cancer* **76**:1115-1118 (1997); Hankinson *et al., Lancet* **351**:1393-1396 (1998); Ma *et al., J. Natl. Cancer Inst.* **91**:620-625 (1999); Karasik *et al., J. Clin. Endocrinol Metab.* **78**:271-276 (1994). Estos resultados sugieren que el IGF-I y el IGF-II actúan como potentes señales mitogénicas y anti-apoptóticas, y su sobre-expresión se correlaciona con una prognosis poco exacta en pacientes con varios tipos de cáncer.

[0010] Utilizando modelos de ratones con desactivación génica (***"knockout mouse models"***), varios estudios han establecido además el papel de los IGFs en el crecimiento tumoral. Con el desarrollo de la tecnología para la eliminación génica condicional, específica de tejidos, se diseñó un modelo con ratones de deficiencia de IGF-I hepático (LID). La eliminación específica del hígado del gen *igf1* anuló la expresión de ARNm IGF-I y causó una reducción dramática en los niveles de IGF-I en

circulación. Yakar *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:7324-7329 (1999). Cuando se indujeron tumores mamarios en ratón LID, niveles reducidos de IGF-1 en circulación resultaron en reducciones significativas en el desarrollo, crecimiento, y metástasis de cáncer, mientras que crecientes niveles de IGF-1 en circulación se asociaron con un mayor crecimiento del tumor. Wu *et al., Cancer Res.* **63**:4384-4388 (2003).

[0011] Varios documentos informativos han divulgado que la inhibición de las expresión de IGF-IR y/o señalización lleva a la inhibición del crecimiento del tumor, tanto *in vitro* como *in vivo*. De igual manera se ha demostrado que la inhibición de la señalización de IGF aumenta la susceptibilidad de las células tumorales a los agentes quimioterapéuticos. Se ha desarrollado una variedad de estrategias (oligonucleótidos complementarios, receptor soluble, péptidos inhibitorios, mutantes de receptor negativo dominante, moléculas pequeñas que inhiben la actividad cinasa y anticuerpos anti-hIGF-IR) para inhibir la vía de señalización IGF-IR en células tumorales. Un enfoque ha sido dianizar (***"to target"***) la actividad cinasa de IGF-IR con inhibidores de molécula pequeña. Recientemente se identificaron dos compuestos como inhibidores de cinasa de molécula pequeña capaces de inhibir selectivamente el IGF-IR. García-Echeverría *et al., Cancer Cell* **5**:231-239 (2004); Mitsiades *et al., Cancer Cell* **5**:221-230 (2004). La inhibición de la actividad cinasa IGF-IR eliminó la supervivencia mediada por IGF-I y la formación de colonias en agar blando de células de cáncer de mama humano MCF-7. García-Echeverría *et al., Cancer Cell* **5**:231-239 (2004). Cuando se administró un inhibidor de cinasa IGF-IR a ratones portadores de xenoinjertos de tumor, se inhibió la señalización IGF-IR en xenoinjertos de tumor y se redujo significativamente el crecimiento de fibrosarcomas inducidos por IGF-IR. García-Echeverría *et al., Cancer Cell* 5:231-239 (2004). Se observó un efecto similar sobre neoplasias malignas hematológicas, especialmente mieloma múltiple. En células de mieloma múltiple, un inhibidor de cinasa IGF-IR de molécula pequeña demostró una potencia mayor de >16 veces contra el IGF-IR, comparado con el receptor de insulina, y fue

análogamente efectivo en inhibir el crecimiento y la supervivencia de las células. Mitsiades *et al., Cancer Cell* **5**:221-230 (2004). El mismo compuesto se inyectó intraperitonealmente en ratones e inhibió el crecimiento de células de mieloma múltiple y aumentó la supervivencia de los ratones. Mitsiades *et al., Cancer Cell* **5**:221-230 (2004). Cuando se combinó con otros quimioterapéuticos en dosis subterapéuticas, la inhibición de la actividad cinasa IGF-IR redujo sinérgicamente la masa tumoral. Mitsiades *et al., Cancer Cell* **5**:221-230 (2004).

[0012] Otro enfoque para inhibir la señalización de IGF ha sido el desarrollo de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra el receptor IGF-IR. Varios grupos han desarrollado anticuerpos contra IGF-IR que inhiben la autofosforilación estimulada por IGF-I, inducen la internalización y degradación del receptor, y disminuyen la proliferación y supervivencia de diversas líneas de células cancerosas humanas. Hailey *et al., Mol Cancer Ther.* **1**:1349-1353 (2002); Maloney *et al., Cancer Res.* **63**:5073-5083 (2003); Benini *et al., Clin. Cancer Res.* **7**:1790-1797 (2001); Burtrum *et al., Cancer Res.* **63**:8912-8921 (2003). Adicionalmente, en modelos de tumor de xenoinjerto, el bloqueo de IGF-IR resultó en una inhibición de crecimiento significativa de tumores de mama, renales y pancreáticos *in vivo.* Burtrum *et al., Cancer Res.* **63**:8912-8921 (2003); Maloney *et al., Cancer Res.* **63**:5073-5083 (2003). Experimentos utilizando anticuerpos IGF-IR humanizados quiméricos arrojaron resultados similares, inhibiendo el crecimiento de células de cáncer de mama *in vitro* y en xenoinjertos de tumor. Sachdev *et al.*, Cancer Res. **63**:627-635 (2003). Otros anticuerpos IGF-IR humanizados bloquearon la fosforilación de la tirosina inducida por IGF-I e inhibieron el crecimiento en tumores de mama y pulmón amicrocítico, así como *in vivo.* Cohen *et al., Clin. Cancer Res.* **11**:2063-2073 (2005); Goetsch *et al., Int. J. Cancer* **113**:316-328 (2005).

[0013] Niveles crecientes de IGF-I se han asociado igualmente con varios estados patológicos no cancerosos, incluidos acromegalia y gigantismo (Barkan, Cleveland Clin. J. Med. 65: 343, 347-349, 1998), mientras que la función anormal de receptor IGF-I/IGF-II ha sido implicada

en psoriasis (Wraight *et al.*, Nat. Biotech. 18: 521-526, 2000), aterosclerosis y restenosis del músculo liso de los vasos sanguíneos luego de angioplastia (Bayes-Genis *et al.*, Circ. Res. 86: 125-130, 2000). Niveles cada vez mayores de IGF-I han sido implicados en diabetes o en complicaciones asociadas con diabetes, tales como proliferación microvascular (Smith *et al.*, Nat. Med. 5: 1390-1395, 1999).

[0014] En el arte se han divulgado anticuerpos contra IGF-I and IGF-II. Véase, por ejemplo, Goya *et al., Cancer Res.* **64**:6252-6258 (2004); Miyamoto *et al., Clin. Cancer Res.* **11**:3494-3502 (2005). Adicionalmente, véase WO 05/18671, WO 05/28515 y WO 03/93317.

SUMARIO

[0015] Incorporaciones de la invención se relacionan con proteínas de unión que específicamente se unen a factores insulinoides y reducen el crecimiento de tumores. En una incorporación, las proteínas de unión son anticuerpos monoclonales completamente humanos, o sus fragmentos de unión que se unen específicamente a factores de crecimiento insulinoide y reducen el crecimiento de los tumores. Los mecanismos mediante los cuales es posible lograr esto pueden incluir y no se limitan a la inhibición de la unión de IGF-I/II a su receptor IGF-IR, inhibición de señalización IGF-IR inducida por IGF-I/II, o depuración cada vez mayor e IGF-I/II, reduciendo así la concentración efectiva de IGF-I/II.

[0016] Por lo tanto, algunas incorporaciones proveen una proteína de unión específica aislada, completamente humana, que preferencialmente se une al factor II de crecimiento insulinoide (IGF-II) con reactividad cruzada al factor I de crecimiento insulinoide (IGF-I) y neutraliza la actividad de IGF-I e IGF-II. En ciertos aspectos, la proteína de unión se une a IGF-II con una afinidad por lo menos 2.5 mayor que a IGF-I. En otros aspectos, la proteína de unión se une a IGF-II con una afinidad por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 7, por lo menos 10, por lo menos 50, por lo menos 60, por lo menos 100 o por lo menos 150 veces mayor que a IGF-I.

[0017] En algunas incorporaciones, la proteína de unión específica tiene una EC_{50} de no más de 15 nM para inhibir la fosforilación del receptor IGF-I dependiente de IGF-I en células NIH3T3 que expresan IGF-1R ectópicamente. En algunos aspectos, la proteína de unión específica tiene una EC_{50} de no más de 15 nM, no más de 10 nM, o no más de 8 nM para inhibir la fosforilación del receptor IGF-I dependiente de IGF-I en células NIH3T3 que expresan IGF-1R ectópicamente.

[0018] En algunas incorporaciones, la proteína de unión específica tiene una EC_{50} de no más de 5 nM, no más de 4 nM, o no más de 3 nM para inhibir la fosforilación del receptor IGF-I dependiente de IGF-II en células NIH3T3 que expresan IGF-1R ectópicamente.

[0019] En otras incorporaciones, la proteína de unión específica inhibe más del 70% de la proliferación, dependiente de IGF-II, de células NIH3T3 que expresan hIGF-IR recombinante con una EC_{50} de no más de 25 nM, no más de 20 nM, no más de 15 nM, o no más de 10 nM.

[0020] En otras incorporaciones, la proteína de unión específica inhibe más del 70% de la proliferación dependiente de IGF-I de células NIH3T3 que expresan hIGF-IR recombinante con una EC_{50} de no más de 40 nM, no más de 30 nM, o no más de 25 nM.

[0021] En ciertas incorporaciones, la proteína de unión específica compite para unión con un anticuertpo monoclonal que comprende una secuencia de cadena pesada variable seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NO.: 2, SEQ ID NO.: 6, SEQ ID NO.: 10, SEQ ID NO.: 14 y SEQ ID NO.: 18, y que comprende una secuencia de cadena ligera variable seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NO.: 4, SEQ ID NO.: 8, SEQ ID NO.: 12 y SEQ ID NO.:16.

[0022] Una incorporación de la invención es un anticuerpo completamente humano que se une a IGF-I con una K_d menor de 500 picomolar (pM). Más preferiblemente, el anticuerpo se une con una K_d menor de 450 picomolar (pM). Más preferiblemente, el anticuerpo se une con una K_d menor de 410 picomolar (pM). Más preferiblemente, el anticuerpo se une con una K_d de menos de 350 pM. Aún más

preferiblemente, el anticuerpo se une con una K_d de menos de 300 pM. La afinidad y/o avidez puede cuantificarse mediante BIACORE®, como se describe en esta solicitud.

[0023] Todavía otra incorporación de la invención es un anticuerpo monoclonal completamente humano que se une a IGF-II con una K_d de menos de 175 picomolar (pM). Más preferiblemente, el anticuerpo se une con una K_d menor de 100 picomolar (pM). Más preferiblemente, el anticuerpo se une con una K_d menor de 50 picomolar (pM). Más preferiblemente, el anticuerpo se une con una K_d menor de 5 picomolar (pM). Aún más preferiblemente, el anticuerpo se une con una K_d de menos de 2 pM.

[0024] En ciertas incorporaciones, la proteína de unión específica es un anticuerpo monoclonal completamente humano o un fragmento de unión de un anticuerpo monoclonal completamente humano. Los fragmentos de unión pueden incluir fragmentos tales como Fab, Fab' o $F(ab')_2$ y Fv.

[0025] Una incorporación de la invención comprende anticuerpos monoclonales completamente humanos 7.251.3 (Número de Accesión ATCC PTA-7422), 7.34.1 (Número de Accesión ATCC PTA-7423) y 7.159.2 (Número de Accesión ATCC PTA-7424) que específicamente se unen a IGF-I/II, como se discute con más detalle en las siguientes secciones.

[0026] En algunas incorporaciones la proteína de unión específica que se une a factor II de crecimiento insulinoide (IGF-II) con reactividad cruzada al factor I de crecimiento insulinoide (IGF-I), o su fragmento de unión pueden incluir un polipéptido de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO.: 6, y un polipéptido de cadena ligera que tiene la secuencia de SEQ ID NO.: 8.

[0027] La proteína de unión específica puede incluir un polipéptido de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO.: 10, y un polipéptido de cadena ligera que tiene la secuencia de SEQ ID NO.: 12.

[0028] La proteína de unión específica de la invención puede incluir un polipéptido de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO.: 14

y un polipéptido de cadena ligera que tiene la secuencia de SEQ ID NO.: 16.

[0029] En ciertas incorporaciones, la proteína de unión específica puede estar en una mezcla con una sustancia portadora farmacéuticamente aceptable.

[0030] Otra incorporación incluye moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican cualquiera de las proteínas de unión específicas descritas en esta solicitud, vectores con moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican las proteínas de unión específicas, o una célula hospedera transformada con cualquiera de tales moléculas de ácido nucleico y vectores.

[0031] En ciertas incorporaciones la proteína de unión específica que se une al factor II de crecimiento insulinoide (IGF-II) con reactividad cruzada al factor I de crecimiento insulinoide (IGF-I), o su fragmento de unión no se une específicamente a las proteínas IGF-II o IGF-I cuando las citadas proteínas se ligan a proteínas de unión de factor de crecimiento de insulina.

[0032] Incorporaciones adicionales incluyen métodos de determinar el nivel del factor II de crecimiento insulinoide (IGF-II) y el factor I de crecimiento insulinoide (IGF-I) en una muestra del paciente. Estos métodos pueden incluir proveer una muestra del paciente; contactar la muestra con una proteína de unión específica que se une a factor II de crecimiento insulinoide (IGF-II) con reactividad cruzada al factor I de crecimiento insulinoide (IGF-I), o su fragmento de unión; y determinar el nivel de IGF-I e IGF-II en la citada muestra. En algunos aspectos, la muestra del paciente es sangre.

[0033] Incorporaciones adicionales incluyen métodos de tratar un tumor maligno en un mamífero. Estos métodos pueden incluir seleccionar un mamífero necesitado de tratamiento para un tumor maligno; y administrar al mamífero una dosis terapéuticamente efectiva de una proteína de unión específica que se une a factor II de crecimiento insulinoide (IGF-II) con reactividad cruzada al factor I de crecimiento

insulinoide (IGF-I), o su fragmento de unión. En algunos aspectos el animal es humano. En algunos aspectos la proteína de unión es un anticuerpo monoclonal completamente humano, y se selecciona del grupo conformado por mAb 7.251.3 (Número de Accesión ATCC PTA-7422), mAb 7.34.1 (Número de Accesión ATCC PTA-7423), y mAb 7.159.2 (Número de Accesión ATCC PTA-7424).

[0034] Enfermedades tratables pueden incluir melanoma, cáncer de pulmón amicrocítico, glioma, carcinoma hepatocelular (hígado), tumor tiroideo, cáncer gástrico (estómago), cáncer de próstrata, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de la vejiga, cáncer de pulmón, glioblastoma, cáncer del endometrio, cáncer del riñón, cáncer de colon, cáncer de páncreas, y carcinoma epidermoide.

[0035] Incorporaciones adicionales incluyen métodos de tratar una enfermedad dependiente del factor de crecimiento en un mamífero. Estos métodos incluyen seleccionar un mamífero necesitado de tratamiento para una enfermedad dependiente del factor de crecimiento; y administrar al citado mamífero una dosis terapéuticamente efectiva de una proteína de unión específica que se une a factor II de crecimiento insulinoide (IGF-II) con reactividad cruzada al factor I de crecimiento insulinoide (IGF-I), o su fragmento de unión. En algunos aspectos, el mamífero puede ser un humano. En algunos aspectos la proteína de unión es un anticuerpo monoclonal completamente humano, y se selecciona del grupo conformado por mAb 7.251.3 (Número de Accesión ATCC PTA-7422), mAb 7.34.1 (Número de Accesión ATCC PTA-7423), y mAb 7.159.2 (Número de Accesión ATCC PTA-7424).

[0036] Enfermedades dependientes del factor de crecimiento, susceptibles de tratarse, pueden incluir osteoporosis, diabetes, y enfermedades cardiovasculares. Otros estados patológicos susceptibles de tratarse incluyen acromegalia y gigantismo, psoriasis, aterosclerosis y restenosis de músculo liso de vasos sanguíneos, así como diabetes.

[0037] Incorporaciones adicionales incluyen un conjugado que contiene un anticuerpo monoclonal completamente humano que se une a

factor II de crecimiento insulinoide (IGF-II) con reactividad cruzada al factor I de crecimiento insulinoide (IGF-I), o su fragmento de unión y un agente terapéutico. En algunos aspectos el agente terapéutico puede ser una toxina, un radioisótopo, o una composición farmacéutica.

[0038] En otras incorporaciones, la invención provee anticuerpos monoclonales completamente humanos, o su fragmento de unión, que se unen al factor II de crecimiento insulinoide (IGF-II) con reactividad cruzada al factor I de crecimiento insulinoide (IGF-I), y comprenden una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDRl) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Ser Tyr Tyr Trp Ser" (SEQ ID NO: 21); una región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (CDR2) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Tyr Phe Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser" (SEQ ID NO: 22); y una región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (CDR3) que tiene la secuencia de aminoácidos de "He Thr Gly Thr Thr Lys Gly Gly Met Asp Val" (SEQ ID NO: 23).

[0039] Incorporaciones adicionales incluyen anticuerpos monoclonales completamente humanos, o su fragmento de unión, con una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (CDR1) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His" (SEQ ID NO: 24). Los anticuerpos en esta solicitud pueden incluir asimismo una región determinante de complementariedad de cadena ligera 2 (CDR2) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser" (SEQ ID NO: 25); y una región determinante de complementariedad de cadena ligera 3 (CDR3) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Gln Ser Phe Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val" (SEQ ID NO: 26).

[0040] En otras incorporaciones, la invención provee anticuerpos monoclonales completamente humanos, o su fragmento de unión, que se unen al factor II de crecimiento insulinoide (IGF-II) con reactividad cruzada al factor I de crecimiento insulinoide (IGF-I), y comprenden una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDRl) que tiene

la secuencia de aminoácidos de "Ser Tyr Tyr Trp Ser" (SEQ ID NO: 27); una región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (CDR2) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Tyr Phe Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser" (SEQ ID NO: 28); y una región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (CDR3) que tiene la secuencia de aminoácidos de "He Thr Gly Thr Thr Lys Gly Gly Met Asp Val" (SEQ ID NO: 29).

[0041] Incorporaciones adicionales incluyen anticuerpos monoclonales completamente humanos, o su fragmento de unión, con una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (CDRl) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Thr Gly Arg Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His" (SEQ ID NO: 30); una región determinante de complementariedad de cadena ligera 2 (CDR2) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser" (SEQ ID NO: 31); y una región determinante de complementariedad de cadena ligera 3 (CDR3) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val" (SEQ ID NO: 32).

[0042] En otras incorporaciones, la invención provee anticuerpos monoclonales completamente humanos, o su fragmento de unión, que se unen al factor II de crecimiento insulinoide (IGF-II) con reactividad cruzada al factor I de crecimiento insulinoide (IGF-I), y comprenden una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Ser Tyr Asp Ile Asn" (SEQ ID NO: 33); una región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (CDR2) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly" (SEQ ID NO: 34); y una región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (CDR3) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Asp Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val" (SEQ ID NO: 35).

[0043] Incorporaciones adicionales incluyen anticuerpos monoclonales completamente humanos, o su fragmento de unión, con una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (CDR1) que

tiene la secuencia de aminoácidos de "Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Glu Asn Asn His Val Ser" (SEQ ID NO: 36); una región determinante de complementariedad de cadena ligera 2 (CDR2) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser" (SEQ ID NO: 37); y una región determinante de complementariedad de cadena ligera 3 (CDR3) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Glu Thr Trp Asp Thr Ser Leu Ser Ala Gly Arg Val" (SEQ ID NO: 38).

[0044] En otras incorporaciones, la invención provee anticuerpos monoclonales completamente humanos, o su fragmento de unión, que se unen al factor II de crecimiento insulinoide (IGF-II) con reactividad cruzada al factor I de crecimiento insulinoide (IGF-I), y comprenden una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly" (SEQ ID NO: 81); una región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (CDR2) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Gly Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser" (SEQ ID NO: 82); y una región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (CDR3) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Gln Arg Gly His Ser Ser Gly Trp Trp Tyr Phe Asp Leu" (SEQ ID NO: 83).

[0045] Incorporaciones adicionales incluyen anticuerpos monoclonales completamente humanos, o su fragmento de unión, con una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (CDR1) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Ala" (SEQ ID NO: 84); una región determinante de complementariedad de cadena ligera 2 (CDR2) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser" (SEQ ID NO: 85); y una región determinante de complementariedad de cadena ligera 3 (CDR3) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Gln Gln Ala Asn Asn Phe Pro Phe Thr" (SEQ ID NO: 86).

[0046] En otras incorporaciones, la invención provee anticuerpos monoclonales completamente humanos, o su fragmento de unión, que se unen al factor II de crecimiento insulinoide (IGF-II) con reactividad cruzada

al factor I de crecimiento insulinoide (IGF-I), y comprenden una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Ser Ser Ser Asn Tyr Trp Gly" (SEQ ID NO: 87); una región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (CDR2) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Gly Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser" (SEQ ID NO: 88); y una región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (CDR3) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Gln Arg Gly His Ser Ser Gly Trp Trp Tyr Phe Asp Leu" (SEQ ID NO: 89).

[0047] Incorporaciones adicionales include anticuerpos monoclonales completamente humanos, o su fragmento de unión, con una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (CDR1) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Arg Ala Ser Arg Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala" (SEQ ID NO: 90); una región determinante de complementariedad de cadena ligera 2 (CDR2) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Thr Ala Ser Ser Leu Gln Ser" (SEQ ID NO: 91); y una región determinante de complementariedad de cadena ligera 3 (CDR3) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe Thr" (SEQ ID NO: 92).

[0048] Algunas incorporaciones proveen el uso de las proteínas de unión específicas descritas en esta solicitud en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un tumor maligno. En algunos aspectos, la proteína de unión específica puede ser un anticuerpo monoclonal completamente humano. En ciertos aspectos, la proteína de unión es mAb 7.251.3 (Número de Accesión ATCC PTA-7422) o mAb 7.34.1 (Número de Accesión ATCC PTA-7423) o mAb 7.159.2 (Número de Accesión ATCC PTA-7424). En algunos aspectos, el medicamento es para uso en combinación con un segundo agente anti-neoplásico seleccionado del grupo conformado por un anticuerpo, un agente quimioterapéutico, y un medicamento radioactivo. En algunos aspectos, el medicamento es para uso en conjunción con o luego de una cirugía convencional, un transplante de células madre de la médula ósea o un transplante de células madre de sangre periférica.

[0049] El tumor maligno puede ser melanoma, cáncer de pulmón amicrocítico, glioma, carcinoma hepatocelular (hígado), tumor tiroideo, cáncer gástrico (estómago), cáncer de próstrata, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de la vejiga, cáncer de pulmón, glioblastoma, cáncer del endometrio, cáncer del riñón, cáncer de colon, cáncer de páncreas, y carcinoma epidermoide, por ejemplo.

[0050] Otras incorporaciones proveen el uso de las proteínas de unión específicas descritas en esta solicitud en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad dependiente del factor de crecimiento. En algunos aspectos, la proteína de unión específica es un anticuerpo monoclonal completamente humano y puede seleccionarse del grupo conformado por mAb 7.251.3 (Número de Accesión ATCC PTA-7422), mAb 7.34.1 (Número de Accesión ATCC PTA-7423), y mAb 7.159.2 (Número de Accesión ATCC PTA-7424).

[0051] La enfermedad dependiente del factor de crecimiento puede ser osteoporosis, diabetes, y enfermedades cardiovasculares, por ejemplo.

[0052] Preferiblemente, el anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada con una región determinante de complementariedad (CDR) con una o más de las secuencias mostradas en la Tabla 11. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos de cadena pesada con la CDRI, CDR2, o CDR3 de una o más de las secuencias mostradas en la Tabla 11, o su combinación. Se advierte que aquellas personas de habilidad ordinaria en el arte pueden llevar a cabo fácilmente determinaciones de CDR. *Véase por ejemplo*, Kabat *et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest,* Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD(1991),vols. 1-3.

[0053] Incorporaciones de la invención descritas en esta solicitud se refieren a anticuerpos monoclonales que se unen a IGF-I/II y afectan la función de IGF-I/II. Otras incorporaciones se relacionan con anticuerpos anti-IGF-I/II completamente humanos y preparaciones de anticuerpo anti-IGF-I/II con propiedades deseadas desde una perspectiva terapéutica, incluidas elevada afinidad de unión para IGF-I/II, la capacidad de

neutralizar IGF-I/II *in vitro* e *in vivo*, y la capacidad de inhibir la proliferación de células inducida por IGF-I/II.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0054] Figura 1 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento de tumor de xenoinjerto en ratones atímicos de células NIH3T3 que expresan IGF-II e IGF-IR (células de clon 32) con mAbs 7.159.2, 7.34.1, 7.251.3 comparados con controles IgG2 y PBS. El volumen medio del tumor se muestra en el eje y el tiempo después del implante se muestra en el eje ***x***.

[0055] Figura 2 es un gráfico que muestra el peso corporal en ratones con xenoinjerto del clon 32, tratados con mAbs 7.159.2, 7.34.1, 7.251.3 comparados con controles IgG2 y PBS. El peso medio corporal se muestra en el eje y el tiempo después del implante se muestra en el eje ***x***.

[0056] Figura 3 es un gráfico que muestra la inhibición del crecimiento de tumor de xenoinjerto en ratones atímicos de células NIH3T3 que expresan IGF-I e IGF-IR (células PI2) con mAbs 7.159.2 comparado con control PBS. El volumen medio del tumor se muestra en el eje y el tiempo después del implante (indicado por la fecha) se muestra en el eje ***x***.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0057] Incorporaciones de la invención descritas en esta solicitud se refieren a proteína de unión que específicamente se unen a IGF-II con reactividad cruzada a IGF-I (denominado en esta solicitud "IGFI/II"). En algunas incorporaciones, las proteínas de unión son anticuerpos, o sus fragmentos de unión, y se unen a IGF-II con reactividad cruzada a IGF-I e inhiben la unión de estas proteínas a su receptor, IGF-IR. Otras incorporaciones de la invención incluyen anticuerpos anti-IGF-I/II neutralizantes completamente humanos, y a preparaciones de anticuerpos que son terapéuticamente útiles y se unen a los dos factores de crecimiento

insulinoide. Tales preparaciones de anticuerpo anti-IGF-I/II tienen preferiblemente propiedades terapéuticas deseadas, incluidas una fuerte afinidad de unión para IGF-I/II, la capacidad para neutralizar IGF-I/II *in vitro*, y la capacidad de inhibir la proliferación de células inducida por IGF-I/II.

[0058] Incorporaciones de la invención incluyen igualmente fragmentos de unión aislados de anticuerpos anti-IGF-I/II. Preferiblemente, los fragmentos de unión se derivan de anticuerpos anti-IGF-I/II completamente humanos. Fragmentos ejemplares incluyen Fv, Fab' u otros fragmentos de anticuerpos bien conocidos, como se describe con más detalle en las secciones siguientes. Incorporaciones de la invención incluyen asimismo células que expresan anticuerpos completamente humanos contra IGF-I/II. Ejemplos de células incluyen hibridomas, o células creadas en forma recombinante, tales como células de hámster chino (CHO) que producen anticuerpos contra IGF-I/II.

[0059] Además, incorporaciones de la invención incluyen métodos de usar estos anticuerpos para tratar enfermedades. Los anticuerpos anti-IGF-I/II son útiles para prevenir la transducción de señales IGF-IR mediada por IGF-I/II, inhibiendo así la proliferación de células. El mecanismo de acción de esta inhibición puede incluir la inhibición de IGF-I/II de unión a su receptor, IGF-IR, inhibición de la señalización IGF-IR inducida por IGF-I/II, o depuración mejorada de IGF-I/II disminuyendo ahí la concentración efectiva de IGF-I/II para unirse a IGF-IR. Enfermedades que son susceptibles de tratamiento a través de este mecanismo incluyen, pero no se limitan a, enfermedades neoplásicas, tales como, melanoma, cáncer de pulmón amicrocítico, glioma, carcinoma hepatocelular (hígado), tumores ginecológicos, cáncer de cabeza y cuello, cáncer esofágico, glioblastoma, y neoplasias malignas y tumores de la tiroides, estómago, próstrata, mama, ovarios, vejiga, pulmón, útero, riñón, colon, y páncreas, glándula salival, y colorrecto.

[0060] Otras incorporaciones de la invención incluyen análisis diagnósticos para determinar específicamente la cantidad de IGF-I/II en una

muestra biológica. El kit de análisis puede incluir anticuerpos anti-IGF-I/II junto con la etiquetas necesarias para detectar tales anticuerpos. Estos análisis de diagnóstico son útiles para identificar selectivamente enfermedades relacionadas con el factor de crecimiento incluidas, pero no limitadas a, enfermedades neoplásicas, tales como, melanoma, cáncer de pulmón amicrocítico, glioma, carcinoma hepatocelular (hígado), tumores ginecológicos, cáncer de cabeza y cuello, cáncer esofágico, glioblastoma, y neoplasias malignas y tumores de la tiroides, estómago, próstrata, mama, ovarios, vejiga, pulmón, útero, riñón, colon, y páncreas, glándula salival, y colorrecto. Otros estados patológicos no neoplásicos pueden incluir acromegalia y gigantismo, psoriasis, osteoporosis, aterosclerosis y restenosis de músculo liso de vasos sanguíneos, así como diabetes.

[0061] Incorporaciones adicionales, características, y similares relativas a anticuerpos anti-IGF-I/II se proveen con más detalle a continuación.

Listado de Secuencias

[0062] Incorporaciones de la invención incluyen los anticuerpos anti-IGF-I/II específicos enumerados a continuación en la Tabla 1. Esta tabla indica el número de identificación de cada anticuerpo anti-IGF-I/II, junto con el número SEQ ID de los correspondientes genes de cadena pesada y cadena ligera. Además, también en la siguiente Tabla 1 se proveen las secuencias de línea germinal de la cual se derivan cada cadena pesada y cadena ligera.

[0063] A cada anticuerpo se ha asignado un número de identificación que incluye cualquiera de los dos o tres números separados por uno o dos puntos decimales. En algunos casos, se prepararon varios clones de un anticuerpo. Aunque los clones tienen las mismas secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos que la secuencia parental, pueden enumerarse también separadamente, con el número de clon indicado por el número a la derecha de un segundo punto decimal. Por consiguiente, por ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos del anticuerpo 7.159.2 son

idénticas a las secuencias del anticuerpo 7.159.1.

[0064] Como puede observarse comparando las secuencias en el listado de secuencias, SEQ ID NOs.: 1-20 difieren de las SEQ ID NOs.: 39-58 porque SEQ ID NOs.: 39-58 incluyen el péptido señal, no traducido, y las regiones de dominio constante para cada cadena secuenciada ligera y pesada.

TABLA 1

mAb ID No.:	Secuencia	SEQ ID NO:
7.158.1	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	1
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	2
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	3
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	4
7.159.2	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	5
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	6
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	7
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	8
7.34.1	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	9
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	10
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	11
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	12
7.251.3	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	13
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	14
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	15
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	16
7.234.1	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	17
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	18
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	19
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	20
7.158.1	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	39
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	40
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	41
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	42
7.159.2	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	43
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	44
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	45
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	46
7.34.1	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	47
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	48
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	49
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	50
7.251.3	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	51
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	52
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	53
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	54
7.234.1	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	55
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	56
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	57
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	58

mAb ID No.:	Secuencia	SEQ ID NO:
Línea germinal (7.158.1)	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	59
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	60
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	61
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	62
Línea germinal (7.159.1)	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	63
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	64
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	65
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	66
Línea germinal (7.34.1)	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	67
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	68
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	69
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	70
Línea germinal (7.251.3)	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada	71
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena pesada	72
	Secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera	73
	Secuencia de aminoácidos que codifica la región variable de la cadena ligera	74

Definiciones

[0065] A menos que se defina lo contrario, los términos científicos y técnicos empleados en esta solicitud tendrán los significados que se entienden comúnmente por aquellas personas de experiencia ordinaria en el arte. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos en singular incluirán plurales y los términos en plural incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en conexión con, y las técnicas de, cultivo de células y tejidos, biología molecular, y química de proteínas y oligo- o polinucleótidos y la hibridación descritas aquí son aquellas bien conocidas y comúnmente empleadas en el arte.

[0066] Técnicas estándar se emplean para DNA recombinante, síntesis de oligonucleótidos, y cultivo y transformación de tejidos (verbigracia, electroporación, lipofección). Reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se llevan a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante, o como se realizan comúnmente en el arte, o como se describen en esta solicitud. Las técnicas y procedimientos anteriores se efectúan por lo general de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en el arte y como se describen en varias referencias generales y más específicas, que se citan y discuten a todo lo

largo de la presente solicitud. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001)), que se incorpora en esta solicitud por referencia. Las nomenclaturas utilizadas en conexión con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, la química analítica, la química orgánica sintética, y la química médica y farmacéutica descritos aquí son aquellas bien conocidas y comúnmente empleadas en el arte. Técnicas estándar se usan para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación, y administración, y tratamiento de pacientes.

[0067] Tal como se utiliza de acuerdo con la presente divulgación, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

[0068] El término "IGF-I" se refiere a la molécula factor I de crecimiento insulinoide, y el término "IGF-II" se refiere a la molécula factor II de crecimiento insulinoide. El término "IGF-I/II" se refiere a las dos moléculas, los factores I y II de crecimiento insulinoide, y se refiere a la unión preferencial a IGF-II con reactividad cruzada a IGF-I. Por consiguiente, un anticuerpo que se une a IGF-I/II se unirá preferencialmente a IGF-II, pero reaccionaría cruzadamente con IGF-I, uniéndose a IGF-II con una afinidad mayor que a IGF-I. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a IGF-II con una afinidad 2.5 veces mayor que a IGF-I. En ciertas incorporaciones, el anticuerpo puede unirse a IGF-II con una afinidad por lo menos 5, por lo menos 10, por lo menos 25, por lo menos 50 o por lo menos 150 veces mayor que a IGF-I.

[0069] El término "neutralizante" cuando se refiere a un anticuerpo tiene que ver con la capacidad de un anticuerpo de eliminar, o reducir significativamente, la actividad de un antígeno diana. Por consiguiente, un anticuerpo anti-IGF-I/II "neutralizante" es capaz de eliminar o reducir significativamente la actividad de IGF-I/II. Un anticuerpo IGF-I/II neutralizante puede, por ejemplo, actuar bloqueando la unión de IGF-I/II a su receptor IGF-IR. Al bloquear esta unión, la transducción de señales

mediada por IGF-IR se elimina significativa, o completamente. En el mejor de los casos, un anticuerpo neutralizante contra IGF-I/II inhibe la proliferación de las células.

[0070] El término "polinucleótido aislado", tal como se emplea en esta solicitud, significará un polinucleótido que se ha aislado de su entorno de ocurrencia natural. Tales polinucleótidos pueden ser ADNc genómico o sintético. Los polinucleótidos aislados preferiblemente no se asocian con todos o una porción de los polinucleótidos con los cuales se asocian en la naturaleza. Los polinucleótidos aislados pueden enlazarse operacionalmente a otro polinucleótido al que no está enlazado en la naturaleza. Adicionalmente, los polinucleótidos aislados preferiblemente no ocurren en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

[0071] El término "proteína aislada", mencionado en esta solicitud, significa una proteína que se ha aislado de su entorno de ocurrencia natural. Tales proteínas pueden derivarse de ADN genómico, ADNc, ADN recombinante, ARN recombinante, u origen sintético o alguna combinación de los mismos. En virtud de su origen, o fuente de derivación, la "proteína aislada" (1) no se asocia con proteínas halladas en la naturaleza, (2) está libre de otras proteínas de la misma fuente, verbigracia, libre de proteínas murinas, (3) se expresa por una célula de una especie diferente, o (4) no ocurre en la naturaleza.

[0072] El término "polipéptido" se emplea aquí como un término genérico para referirse a una proteína natural, fragmentos, o análogos de una secuencias de polipéptidos. Por lo tanto, una proteína natural, fragmentos, y análogos son especies del género polipéptido. Polipéptidos preferidos de acuerdo con la invención comprenden las moléculas de inmunoglobulina humana de cadena pesada y las moléculas de inmunoglobulina humana de cadena ligera kappa, así como moléculas de anticuerpos formadas por combinaciones que comprenden las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada con moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera, tales como las moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera kappa o lambda y, viceversa, así como fragmentos y análogos de las

mismas. Polipéptidos preferidos de acuerdo con la invención pueden incluir asimismo únicamente las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada humana o sus fragmentos.

[0073] El término "de ocurrencia natural", tal como se emplea en esta solicitud, como aplicado a un objeto, se refiere al hecho de que un objeto puede hallarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptidos o polinucleótidos que está presente en un organismo (incluidos virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionalmente por el hombre en el laboratorio, o de otro modo, es de ocurrencia natural.

[0074] El término "enlazado operacionalmente", tal como se emplea en esta solicitud, se refiere a posiciones de componentes así descritos que están en una relación que les permite funcionar en su manera prevista. Por ejemplo, una secuencia de control "enlazada operacionalmente" a una secuencia codificante está conectada en tal forma que la expresión de la secuencia codificante se logra bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0075] El término "polinucleótido", tal como se menciona en esta solicitud, significa una forma polimérica de nucleótidos de por lo menos 10 bases en longitud, ribonucleótidos o deoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido o hetero-bicatenarios ARN-ADN. El término incluye formas mono- y bicatenarias de ADN.

[0076] El término "oligonucleótido", mencionado en esta solicitud, incluye nucleótidos modificados y de ocurrencia natural, unidos entre sí por enlaces de oligonucleótidos de ocurrencia natural y no ocurrencia natural. Los oligonucleótidos son un subconjunto de polinucleótidos que comprenden generalmente una longitud de 200 bases o menos. Preferiblemente los oligonucleótidos son de 10 a 60 bases de longitud y, muy preferiblemente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ó 20 a 40 bases de longitud. Los oligonucleótidos son usualmente monocatenarios, por ejemplo, para sondas; aunque los oligonucleótidos pueden ser bicatenarios, por ejemplo, para uso en la construcción de un mutante génico. Los

oligonucleótidos de la invención pueden ser oligonucleótidos de hebra transcrita o hebra complementaria (***"sense or antisense oligonucleotides"***).

[0077] El término "nucleótidos de ocurrencia natural", mencionado en esta solicitud, incluye deoxiribonucleótidos y ribonucleótidos. El término "nucleótidos modificados", mencionado en esta solicitud, incluye nucleótidos con grupos azúcar modificados o sustituidos, y similares. El término "enlaces de oligonucleótido", mencionado en esta solicitud, incluye enlaces de oligonucleótidos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforaniladato, fosforoamidato, y similares. *Véase por ejemplo*, LaPlanche *et al., Nucl. Acids Res.* **14**: 9081 (1986); Stec *et al., J. Am. Chem. Soc.* **106**:6077 (1984); Stein *et al., Nucl. Acids Res.* **16**:3209 (1988); Zon *et al., Anti-Cancer Drug Design* **6**:539 (1991); Zon *et al., Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, páginas 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec *et al.,* Patente de los Estados Unidos No. 5,151,510; Uhlmann and Peyman *Chemical Reviews* **90**:543 (1990), cuyas divulgaciones se incorporan en esta solicitud por referencia. Un oligonucleótido puede incluir una etiqueta para detección, si se desea.

[0078] El término "hibridar selectivamente", mencionado en esta solicitud, significa unir detectable y específicamente. Los polinucleótidos, oligonucleótidos y sus fragmentos se hibridan selectivamente a hebras de ácido nucleico bajo condiciones de hibridación y lavado que minimizan cantidades apreciables de unión detectable a ácidos nucleicos no específicos. Pueden emplearse condiciones de alta rigurosidad para lograr condiciones de hibridación selectiva, como se conocen en el arte y se discuten en esta solicitud. Generalmente, la homología de secuencia de ácidos nucleicos entre los polinucleótidos, oligonucleótidos, y fragmentos de anticuerpo y una secuencia de ácidos nucleicos de interés será por lo menos 80% y, más típicamente, con homologías preferiblemente crecientes de por lo menos 85%, 90%, 95%, 99%, y 100%. .

[0079] Dos secuencias de aminoácidos son homólogas si existe una identidad parcial o completa entre sus secuencias. Por ejemplo, una

de secuencia entre dos o más secuencias de polinucleótidos o aminoácidos: "secuencia de referencia," "ventana de comparación," "identidad de secuencia," "porcentaje de identidad de secuencia," e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida, usada como base para una comparación de secuencias. Una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia mayor, por ejemplo, como un segmento de un ADNc de longitud completa o secuencia de genes dada en un listado de secuencias, o puede comprender una secuencia completa de ADNc o genes. Generalmente, una secuencia de referencia es por lo menos 18 nucleótidos ó 6 aminoácidos de longitud, frecuentemente por lo menos 24 nucleótidos u 8 aminoácidos de longitud y, a menudo, por lo menos 48 nucleótidos o 16 aminoácidos de longitud. Puesto que dos secuencias de polinucleótidos o aminoácidos pueden cada una (1) comprender una secuencia (es decir, una porción de la secuencia completa de polinucleótidos o aminoácidos) que es similar entre las dos moléculas, y (2) pueden comprender además una secuencia que es divergente entre las dos secuencias de polinucleótidos o aminoácidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) moléculas se realizan típicamente cotejando secuencias de las dos moléculas sobre una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similaridad de secuencia. Una "ventana de comparación," tal como se emplea en esta solicitud, se refiere a un segmento conceptual de por lo menos 18 posiciones de nucleótidos contiguos o 6 aminoácidos, en donde una secuencia de polinucleótidos o una secuencia de aminoácidos pueden compararse con una secuencia de referencia de por lo menos 18 nucleótidos contiguos o 6 secuencias de aminoácidos, y en donde la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones, eliminaciones, sustituciones, y similares (es decir, vacíos) de 20 por ciento o menos, comparada con la secuencia de referencia (la cual no comprende adiciones o eliminaciones) para alineamiento óptimo de las dos secuencias. El alineamiento óptimo de secuencias para alinear una ventana de comparación puede llevarse a cabo mediante el algoritmo de homología local de Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* **2**:482 (1981),

mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* **48**:443 (1970), mediante la búsqueda del método de similaridad de Pearson and Lipman, *Proc. Natal. Acad. Sci.* (U.S.A.) **85**:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en la Versión 7.0 del Paquete de Software Wisconsin Genetics, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), los paquetes de software GENEWORKS™, o MACVECTOR®), o mediante inspección, y se selecciona el mejor alineamiento (es decir, el que resulta en el máximo porcentaje de homología sobre la ventana de comparación), generado mediante los diferentes métodos.

[0083] El término "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de polinucleótidos o aminoácidos son idénticas (es decir, sobre una base nucleótido-por-nucleótido o residuo-por-residuo) sobre la ventana de comparación. El término "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las cuales la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, U, o I) o residuo de aminoácido ocurre en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. El término "identidad sustancial", tal como se emplea en esta solicitud, denota una característica de una secuencia de polinucleótidos o aminoácidos, en donde el polinucleótido o aminoácido comprende una secuencia que tiene por lo menos 85 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente por lo menos 90 a 95 por ciento de identidad de secuencia, más preferiblemente por lo menos 99 por ciento de identidad de secuencia, comparada con un secuencia de referencia sobre una ventana de comparación de por lo menos 18 posiciones de nucleótidos (6 aminoácidos), frecuentemente sobre una ventana de por lo menos 24-48 posiciones de nucleótidos (8-16 aminoácidos), en donde el porcentaje de

identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia con la secuencia que puede incluir eliminaciones o adiciones que totalizan 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia sobre la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande.

[0084] Tal como se emplea en esta solicitud, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas se ciñen al uso convencional. Véase *Immunology - A Synthesis* (2d ed., Golub, E.S. y D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)) que se incorpora en esta solicitud por referencia. Los estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como aminoácidos α-, α-disustituidos, N-alquil aminoácidos, ácido láctico, y otros aminoácidos no convencionales pueden ser igualmente componentes apropiados para polipéptidos de la presente invención. Ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ-carboxiglutamato, ε-N,N,N-trimetillisina, ε-N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ-N-metilarginina, y otros aminoácidos similares e iminoácidos (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). En la notación de polipéptido usada en esta solicitud, la dirección de la izquierda es la dirección amino-terminal y la dirección derecha es la dirección carboxi-terminal, de acuerdo con la práctica y la convención estándar.

[0085] Análogamente, a menos que se especifique lo contrario, el extremo izquierdo de secuencias de polinucleótidos monocatenarias es el extremo 5'; la dirección izquierda de secuencias de polinucleótidos bicatenarias se denomina la dirección 5'. La dirección de la adición 5' a 3' de transcriptos de ARN naciente se denomina la dirección de transcripción; regiones de la secuencia en la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que son 5' al extremo 5' del transcripto ARN se denominan "secuencias en el extremo 5'"; regiones de la secuencia en la hebra de ADN que tengan la misma secuencia que el ARN y que sean 3' al extremo 3' del transcripto de ARN se denominan "secuencias en el extremo 3'".

[0086] Aplicado a los polipéptidos, el término "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean en forma óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de vacíos faltantes (***"default gap weights"***), comparten por lo menos 80 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente por lo menos 90 por ciento de identidad de secuencia, más preferiblemente por lo menos 95 por ciento de identidad de secuencia y, muy preferiblemente por lo menos 99 por ciento de identidad de secuencia. Preferiblemente, las posiciones de residuo que no son idénticas difieren por sustituciones de aminoácidos conservadores. Sustituciones de aminoácidos conservadores se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos con cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; un grupo de aminoácidos con cadenas laterales alifáticas-hidroxilo es serina y treonina; un grupo de aminoácidos con cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos con cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina, y triptófano; un grupo de aminoácidos con cadenas laterales básicas es lisina, arginina, e histidina; y un grupo de aminoácidos con cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Grupos preferidos de sustitución de aminoácidos conservadores son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutámico-aspártico, y asparagina-glutamina.

[0087] Como se discute en esta solicitud, variaciones menores en las secuencias de aminoácidos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina se contemplan como comprendidas por la presente invención, con la salvedad de que las variaciones en la secuencia de aminoácidos mantengan por lo menos 75%, más preferiblemente por lo menos 80%, 90%, 95% y, muy preferiblemente, 99% de identidad de secuencia con los anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina descritos aquí. En particular, se contemplan reemplazos de aminoácidos conservadores. Reemplazos conservadores son aquellos que tienen lugar en una familia de aminoácidos con cadenas laterales relacionadas. Aminoácidos genéticamente codificados se dividen

por lo general en familias: (1) ácidos = aspartato, glutamato; (2) básicos = lisina, arginina, histidina; (3) no polares = alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares no cargados = glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Familias más preferidas son: serina y treonina son una familia alifática-hidroxi; asparagina y glutamina son una familia que contiene amida; alanina, valina, leucina e isoleucina son una familia alifática; y fenilalanina, triptófano, y tirosina son una familia aromática. Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado no tendrá un efecto importante sobre la función de la unión o las propiedades de la molécula resultante, especialmente si el reemplazo no incluye un aminoácido en un sitio base (***"a framework site"***). Si un cambio de aminoácido resulta en un péptido funcional puede determinarse fácilmente analizando la actividad específica del derivado del polipéptido. Los análisis se describen con detalle en esta solicitud. Fragmentos o análogos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina pueden prepararse fácilmente por aquellas personas de experiencia ordinaria en el arte. Términos amino y carboxi preferidos de fragmentos o análogos ocurren cerca de los límites de dominios funcionales. Dominios estructurales y funcionales pueden identificarse por comparación de los datos de la secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos con bases de datos de secuencias públicas o patentadas. Preferiblemente, se emplean métodos de comparación computarizados para identificar motivos de secuencia o dominios predichos de conformación de proteínas, que ocurren en otras proteínas de estructura y/o función conocida. Se conocen métodos para identificar secuencias de proteínas que se pliegan en una estructura tri-dimensional conocida. Bowie el al., *Science* **253:**164 (1991). Por lo tanto, los anteriores ejemplos demuestran que aquellas personas expertas en el arte pueden reconocer motivos de secuencias y conformaciones estructurales que pueden usarse para definir dominios

estructurales y funcionales de acuerdo con los anticuerpos descritos en esta solicitud.

[0088] Sustituciones preferidas de aminoácido son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos de proteínas, (4) alteran las afinidades de unión, y (4) confieren o modifican otras propiedades físico-químicas o funcionales de tales análogos. Los análogos pueden incluir varias muteínas de una secuencia distinta de la secuencia peptídica de ocurrencia natural. Por ejemplo, sustituciones simples o múltiples de aminoácidos (preferiblemente sustituciones de aminoácidos conservadores) pueden hacerse en la secuencia de ocurrencia natural (preferiblemente en la porción del polipéptido fuera del dominio(s) que forma contactos intermoleculares. Una sustitución de aminoácidos conservadores no debería cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia parental (por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debería tender a romper una hélice que ocurra en la secuencia parental, o alterar otros tipos de estructura secundaria, que caracteriza a la secuencia parental). Ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos, reconocidas por el arte, se describen en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, ed., W. H. Freeman and Company, New York 1984); *Introduction to Protein Structure* (Branden, C. and Tooze, J. eds., Garland Publishing, New York, N. Y. 1991); y Thornton *et al.*, *Nature* **354**: 105 (1991), las cuales se incorporan en esta solicitud por referencia.

[0089] El término "fragmento de polipéptido", tal como se emplea en esta solicitud, se refiere a un polipéptido que tiene una eliminación amino-terminal y/o carboxi-terminal, pero donde la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia de ocurrencia natural deducida, por ejemplo, de una secuencia de ADNc de longitud completa. Los fragmentos son típicamente por lo menos 5, 6, 8 ó 10 aminoácidos de largo, preferiblemente por lo menos 14 aminoácidos de largo, más preferiblemente por lo menos 20 aminoácidos de largo,

de uno o más aminoácidos de una secuencia de consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) puede emplearse para generar péptidos más estables. Adicionalmente, péptidos restringidos que comprenden una secuencia de consenso o una variación de la secuencia de consenso sustancialmente idéntica pueden generarse por métodos conocidos en el arte (Rizo and Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* **61**:387 (1992) incorporada en esta solicitud por referencia; por ejemplo, agregando residuos internos de cisteína capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares, que ciclan el péptido.

[0091] Tal como se emplea en esta solicitud, el término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido o grupo de polipéptidos compuestos de por lo menos un dominio de unión, que se forma del plegamiento de cadenas polipeptídicas con espacios de unión tri-dimensionales, con formas de superficie interna y distribuciones de carga complementarias a las características de un determinante antigénico de un antígeno. Por lo general un anticuerpo tiene una forma tetramérica, que comprende dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" y una cadena "pesada". Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman un sitio de unión del anticuerpo.

[0092] "Fragmentos de unión" de un anticuerpo se producen mediante técnicas de ADN recombinante, o por segmentación química o enzimática de anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, y anticuerpos de cadena simple. Se entiende que un anticuerpo distinto de un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" tiene idénticos cada uno de sus sitios de unión. Sustancialmente, un anticuerpo inhibe la adhesión de un receptor a un contra-receptor cuando un exceso de anticuerpo reduce la cantidad de receptor ligado al contra-receptor en por lo menos alrededor de 20%, 40%, 60% u 80% y, más usualmente en más de alrededor de 85% (medido en un análisis de unión competitiva *in vitro*).

[0093] Tal como se emplea en esta solicitud, una "proteína de unión" o una "proteína de unión específica" son proteínas que se unen específicamente a una molécula diana. Los anticuerpos, y fragmentos de

unión de anticuerpos, son proteínas de unión.

[0094] El término "epítopo" incluye cualquier determinante de proteína capaz de unión específica a una inmunoglobulina o receptor de linfocito T. Habitualmente los determinantes epitópicos constan de agrupaciones de superficie químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y, usualmente, poseen características estructurales tri-dimensionales específicas, así como características de carga específicas. Se dice que un anticuerpo une específicamente un antígeno cuando la constante de disociación es ≤ 1 μM, preferiblemente ≤ 100 nM y, muy preferiblemente, ≤ 10 nM.

[0095] El término "agente" se usa en esta solicitud para denotar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, o un extracto elaborado de materiales biológicos.

[0096] "Activo" o "actividad" con respecto a un polipéptido IGF-I/II se refiere a una porción de un polipéptido IGF-I/II que tiene una actividad biológica o inmunológica de un polipéptido IGF-I/II natural. "Biológica" cuando se emplea en esta solicitud se refiere a una función biológica que resulta de la actividad del polipéptido IGF-I/II natural. Una actividad biológica IGF-I/II preferida incluye, por ejemplo, proliferación de células inducida por IGF-I/II.

[0097] "Mamífero", cuando se emplea en esta solicitud, se refiere a cualquier animal que se considera un mamífero. Preferiblemente, el mamífero es un humano.

[0098] La digestión de anticuerpos con la enzima papaína resulta en dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, conocidos también como fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc", que no posee actividad de unión a antígeno pero que tiene la capacidad de cristalizarse. La digestión de anticuerpos con la enzima pepsina resulta en el fragmento $F(ab')_2$ en el cual dos brazos de la molécula anticuerpo permanecen conectados y comprenden dos sitios de unión a antígeno. El fragmento $F(ab')_2$ tiene la capacidad de enlazar cruzadamente el antígeno.

[0099] "Fv", cuando se emplea en esta solicitud, se refiere al

fragmento mínimo de un anticuerpo que conserva sitios de reconocimiento y unión a antígeno.

[0100] "Fab", cuando se emplea en esta solicitud, se refiere a un fragmento de un anticuerpo que comprende el dominio constante de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada.

[0101] El término "mAb" se refiere a un anticuerpo monoclonal.

[0102] "Liposoma", cuando se emplea en esta solicitud, se refiere a una vesícula pequeña que puede ser útil para administración de medicamentos, que pueden incluir el polipéptido IGF-I/II de la invención o anticuerpos contra un polipéptido IGF-I/II, a un mamífero.

[0103] "Etiqueta" o "etiquetado", tal como se emplean en esta solicitud, se refieren a la adición de una fracción detectable a un polipéptido, por ejemplo, una radiomarca, una marca fluorescente, una marca enzimática, una marca quimiluminiscente o un grupo biotinilo. Radioisótopos o radionúclidos pueden incluir ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I); etiquetas fluorescentes pueden incluir rodamina, fósforos de lantánido o FITC (isotiocianato de fluoresceína) y etiquetas enzimáticas pueden incluir peroxidasa de rábano, β-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina.

[0104] El término "agente farmacéutico o medicamento", tal como se emplea en esta solicitud, se refiere a un compuesto químico o composición capaz de inducir un efecto terapéutico deseado, cuando se administra adecuadamente a un paciente. Otros términos de la química contemplados aquí se usan de acuerdo con la práctica convencional en el arte, como se ilustra por *The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)), el cual se incorpora en esta solicitud por referencia).

[0105] Tal como se emplea en esta solicitud, "sustancialmente puro" significa que una especie objeto es la especie predominante presente (es decir, sobre una base molar, es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición) y, preferiblemente, una fracción sustancialmente purificada es una composición en donde la especie objeto

comprende por lo menos alrededor de 50 por ciento (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Generalmente, una composición sustancialmente pura comprenderá más de alrededor de 80 por ciento todas las especies macromoleculares presentes en la composición, más preferiblemente más de alrededor de 85%, 90%, 95%, y 99%. Muy preferiblemente, la especie objeto se purifica a una homogeneidad esencial (especies contaminantes no pueden detectarse en la composición por métodos de detección convencionales), en donde la composición consta esencialmente de una sola especie macromolecular.

[0106] El término "paciente" incluye sujetos humanos y veterinarios.

Anticuerpos Humanos y Humanización de Anticuerpos

[0107] Los anticuerpos humanos evitan algunos de los problemas asociados con anticuerpos que poseen regiones variables y/o constantes murinas o de rata. La presencia de de tales proteínas murinas o derivadas de rata puede conducir a la rápida depuración de los anticuerpos o puede llevar a la generación de una respuesta inmunitaria contra el anticuerpo por un paciente. Con el fin de evitar la utilización de anticuerpos murinos o derivados de rata, pueden generarse anticuerpos completamente humanos mediante la introducción de loci funcionales de anticuerpo humano en un roedor, otro mamífero o animal, de manera que el roedor, otro mamífero o animal produzca anticuerpos completamente humanos.

[0108] Un método para generar anticuerpos completamente humanos es mediante el uso de cepas XenoMouse® de ratones que han sido manipulados genéticamente para contener hasta, pero no menos, de fragmentos configurados de línea germinal de 1000 kb de tamaño del locus de cadena pesada humana y el locus de cadena ligera kappa. *Véase* Mendez *et al., Nature Genetics* 15:146-156 (1997) y Green and Jakobovits *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998). Las cepas XenoMouse® se obtienen de Abgenix, Inc. (Fremont, CA).

[0109] La producción de cepas de ratones XenoMouse® se discute

también y se esboza en las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos Serial No. 07/466,008, presentada el 12 de enero de 1990, 07/610,515, presentada el 8 de noviembre de 1990, 07/919,297, presentada el 24 de julio de 1992, 07/922,649, presentada el 30 de julio de 1992, 08/031,801, presentada el 15 de marzo de 1993, 08/112,848, presentada el 27 de agosto de 1993, 08/234,145, presentada el 28 de abril de 1994, 08/376,279, presentada el 20 de enero de 1995, 08/430,938, 27 de abril de 1995, 08/464,584, presentada el 5 de junio de 1995, 08/464,582, presentada 5 de junio de 1995, 08/463,191, presentada 5 de junio de 1995, 08/462,837, presentada 5 de junio de 1995, 08/486, 853, presentada 5 de junio de 1995, 08/486,857, presentada 5 de junio de 1995, 08/486,859, presentada 5 de junio de 1995, 08/462,513, presentada 5 de junio de 1995, 08/724,752, presentada el 2 de octubre de 1996, y 08/759,620, presentada el 3 de diciembre de 1996 y las Patentes de los Estados Unidos No. 6,162,963, 6,150,584, 6,114,598, 6,075,181, y 5,939,598 y las Patentes Japonesas No. 3 068 180 B2, 3 068 506 B2, y 3 068 507 B2. Véase, asimismo, la Patente Europea No. EP 463,151 B1, otorgamiento publicado el 12 de junio de 1996, Solicitud de Patente Internacional No. WO 94/02602, publicada el 3 de febrero de 1994, Solicitud de Patente Internacional No. WO 96/34096, publicada el 31 de octubre de 1996, WO 98/24893, publicada el 11 de junio de 1998, WO 00/76310, publicada el 21 de diciembre de 2000. Las divulgaciones de cada una de las patentes, solicitudes y referencias citadas anteriormente se incorporan por referencia en su integridad.

[0110] En un método alternativo, otros, incluidos GenPharm International, Inc., han utilizado un enfoque "minilocus". En el enfoque minilocus, un locus Ig exógeno se imita (***"is mimicked"***) mediante la inclusión de segmentos (genes individuales) del locus Ig. Por lo tanto, uno o más genes V_H, uno o más genes D_H, uno o más genes J_H, una región constante mu y, usualmente, una segunda región constante (preferiblemente una región constante gamma) se forman en un constructo para inserción en un animal. Este enfoque se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5,545,807 a Surani *et al.*, y las Patentes de los Estados Unidos No.

5,545,806, 5,625,825, 5,625,126, 5,633,425, 5,661,016, 5,770,429, 5,789,650, 5,814,318, 5,877,397, 5,874,299, y 6,255,458 cada una a Lonberg y Kay, Patente de los Estados Unidos No. 5,591,669 y 6,023.010 a Krimpenfort y Berns, Patentes de los Estados Unidos No. 5,612,205, 5,721,367, y 5,789,215 a Berns *et al.,* y Patente de los Estados Unidos No. 5,643,763 a Choi y Dunn, y Solicitudes de Patente de los Estados Unidos de GenPharm International Serie No. 07/574,748, presentada el 29 de agosto de 1990, 07/575,962, presentada el 31 de agosto de 1990, 07/810,279, presentada el 17 de diciembre de 1991, 07/853,408, presentada el 18 de marzo de 1992, 07/904,068, presentada el 23 de junio de 1992, 07/990,860, presentada el 16 de diciembre de 1992, 08/053,131, presentada el 26 de abril de 1993, 08/096,762, presentada el 22 de julio de 1993, 08/155,301, presentada el 18 de noviembre de 1993, 08/161,739, presentada el 3 de diciembre de 1993, 08/165,699, presentada el 10 de diciembre de 1993, 08/209,741, presentada el 9 de marzo de 1994, cuyas divulgaciones se incorporan en esta solicitud por referencia en su integridad. Véase además, Patente Europea No. 546,073 B1, Solicitudes Internacionales de Patente No. WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852, y WO 98/24884 y Patente de los Estados Unidos No. 5,981,175 cuyas divulgaciones se incorporan en esta solicitud por referencia en su integridad. Véase igualmente, Taylor *et al.,* 1992, Chen *et al.,* 1993, Tuaillon *et al.,* 1993, Choi *et al.,* 1993, Lonberg *et al.,* (1994), Taylor *et al.,* (1994), y Tuaillon *et al.,* (1995), Fishwild *et al.,* (1996), cuyas divulgaciones se incorporan en esta solicitud por referencia en su integridad.

[0111] Kirin ha demostrado asimismo la generación de anticuerpos humanos a partir de ratones en los cuales, mediante fusión de microcélulas, se han introducido grandes segmentos de cromosomas, o cromosomas enteros. Véase Solicitudes de Patente Europea No. 773,288 y 843,961, cuyas divulgaciones se incorporan en esta solicitud por referencia. Adicionalmente, se han generado ratones KM™, que son el resultado del

recuperados se fusionan con una línea de células tipo mieloide para preparar líneas de células de hibridoma inmortales. Estas líneas de células de hibridoma se criban y se seleccionan para identificar líneas de células de hibridoma que produjeron anticuerpos específicos contra el antígeno de interés. En esta solicitud se proveen métodos para la producción de línea de célula de hibridoma múltiple que producen anticuerpos específicos contra IGF-I/II. Además, se provee en esta solicitud la caracterización de los anticuerpos producidos por tales líneas de células, incluidos análisis de secuencia de nucleótidos y aminoácidos de las cadenas ligeras y pesadas de tales anticuerpos.

[0115] Alternativamente, en lugar de fusionarse a células de mieloma para generar hibridomas, se pueden analizar directamente linfocitos B. Por ejemplo, células CD19 + linfocitos B pueden aislarse de ratones XenoMouse® hiperinmunes y dejarse proliferar y diferenciar en células plasmáticas que segreguen anticuerpo. Los anticuerpos de los sobrenadantes celulares se criban entonces mediante ELISA para detectar reactividad contra el inmunógeno IGF-I/II. Asimismo los sobrenadantes podrían cribarse con respecto a inmunorreactividad contra fragmentos de IGF-I/II para mapear/cartografiar posteriormente los diferentes anticuerpos con respecto a unión a dominios de interés funcional en IGF-I/II. Los anticuerpos pueden cribarse asimismo contra otras quimiocinas humanas relacionadas y contra IGF-I/II de rata, ratón y primate no humano, tales como mono cynomolgus, ortólogos de IGF-I/II, los últimos para determinar la reactividad cruzada de especies. Linfocitos B de pocillos que contenían anticuerpos de interés pueden inmortalizarse por varios métodos, incluida fusión para elaborar hibridomas o bien de pocillos individuales o bien de pocillos agrupados, o por infección con EBV o transfección por genes inmortalizantes conocidos y luego esparciendo sobre placas en medio apropiado. Alternativamente, células plasmáticas únicas que segregan anticuerpos con las especificidades deseadas se aíslan luego utilizando un análisis de placa hemolítico específico de IGF-I/II (Babcook *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-48 (1996)). Células dianizadas para lísis son

Secuencias que codifican anticuerpos particulares pueden utilizarse para transformar una célula hospedera mamífera apropiada. La transformación puede hacerse por cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula hospedera, incluido, por ejemplo empacar el polinucleótido en un virus (o en un vector vírico) y transducir una célula hospedera con el virus (o vector) o mediante procedimientos de transfección conocidos en el arte, como se ilustra por las Patentes de los Estados Unidos No. 4,399,216, 4,912,040, 4,740,461, y 4,959,455 (patentes que se incorporan en esta solicitud por referencia). El procedimiento de transformación utilizado depende del hospedero a transformarse. Métodos para introducir polinucleótidos heterólogos en células mamíferas son bien conocidos en el arte e incluyen transfección mediada por dextrina, precipiatación de fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulamiento del polinucleótido(s) en liposomas, y microinyección directa del ADN en los núcleos.

[0119] Líneas de células mamíferas utilizables como hospederas para expresión son bien conocidas en el arte e incluyen muchas células inmortalizadas obtenibles de la American Type Culture Collection (ATCC), incluidas pero no limitadas a células de ovarios de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células 293 de riñón epiteliales humanas, y un número de otras líneas de células. Líneas de células de preferencia particular se seleccionan determinando qué líneas de células tienen elevados niveles de expresión y producen anticuerpos con propiedades de unión IGF-I/II constitutiva.

[0120] Los anticuerpos anti-IGF-I/II son útiles en la detección de IGF-I/II en muestras del paciente y, en consecuencia, son útiles como diagnósticos para estados patológicos como se describe en esta solicitud. Además, basándose en su capacidad de neutralizar significativamente la actividad IGF-I/II (como se demuestra en los siguientes Ejemplos), los anticuerpos anti-IGF-I/II tienen efectos terapéuticos en tratar síntomas y

enfermedades resultantes de la expresión de IGF-I/II. En incorporaciones específicas, los anticuerpos y métodos incluidos en esta solicitud se refieren al tratamiento de síntomas resultantes de la proliferación de células inducida por IGF-I/II. Incorporaciones adicionales implican el uso de anticuerpos y métodos descritos en esta solicitud para tratar enfermedades incluidas enfermedades neoplásicas, tales como, melanoma, cáncer de pulmón amicrocítico, glioma, carcino hepatocelular (hígado), tumor tiroideo, cáncer gástrico (estómago), cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, glioblastoma, cáncer de endometrio, cáncer de de riñón, cáncer de colon, tumores ginecológicos, cáncer de cabeza y cuello, cáncer esofágico, y cáncer pancreático. Otros trastornos de enfermedades no neoplásicas pueden incluir acromegalia y gigantismo, psoriasis, osteoporosis, aterosclerosis y restenosis del músculo liso de vasos sanguíneos, así como diabetes.

Administración Terapéutica y Formulaciones

[0121] Las incorporaciones de la invención incluyen formulaciones farmacéuticas estériles de anticuerpos anti-IGF-I/II que son útiles como tratamientos para enfermedades. Tales formulaciones inhibirían la unión de IGF-I/II a su receptor IGF-IR, tratando así efectivamente estados patológicos donde, por ejemplo, el IGF-I/II sérico o tisular es anormalmente elevado. Los anticuerpos anti-IGF-I/II poseen preferiblemente afinidad adecuada para neutralizar potentemente IGF-I/II y, preferiblemente, tienen una adecuada duracción de acción para permitir una dosificación infrecuente en humanos. Una duración prolongada de acción permitirá pautas posológicas menos frecuentes y más convenientes por vías parenterales alternas tales como inyección subcutánea o intramuscular.

[0122] Formulaciones estériles pueden crearse, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización y reconstitución del anticuerpo. Por lo general el anticuerpo de almacenará en forma liofilizada o en solución.

Composiciones terapéuticas de anticuerpos se ponen generalmente en un envase con un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o frasquito con un adaptador que permita recuperar la formulación, tal como un tapón perforable por una aguja hipodérmica de inyección.

[0123] La vía de administración del anticuerpo está de acuerdo con métodos conocidos, por ejemplo, inyección o infusión por vías intravenosas, intraperitoneales, intracerebrales, intramusculares, intraoculares, intraarteriales, intratecales, inhalación o intralesionales, o mediante sistemas de liberación sostenida, como se anota a continuación. El anticuerpo se administra preferiblemente en forma continua por infusión o por inyección intravenosa rápida.

[0124] Una cantidad efectiva de anticuerpo a emplearse terapéuticamente dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos, la vía de administración, y la condición del paciente. Por consiguiente, será necesario para el terapeuta ajustar la concentración de la dosis y modificar la vía de administración, según se requiera, para obtener el efecto terapéutico óptimo. Típicamente, el médico administrará el anticuerpo hasta que se alcance una dosis que consiga el efecto deseado. La evolución de esta terapia se monitorea fácilmente por análisis convencionales o mediante los análisis descritos en esta solicitud.

[0125] Los anticuerpos, como se describe en esta solicitud, pueden prepararse en una mezcla con una sustancia portadora farmacéuticamente aceptable. Esta composición terapéutica puede administrarse intravenosamente o por la nariz o el pulmón, preferiblemente como un aerosol en líquido o en polvo (liofilizado). La composición puede administrarse también parenteral o subcutáneamente, según se desee. Cuando se administra sistemáticamente, la composición terapéutica debe ser estéril, libre de pirógenos y en una solución parenteralmente aceptable que tenga debidamente en cuenta el pH, la isotonicidad y la estabilidad. Estas condiciones son conocidas por las personas expertas en el arte. En síntesis, las formulaciones terapéuticas de los compuestos descritos en esta

solicitud se preparan para almacenamiento o administración mezclando el compuesto, que tiene el grado deseado de pureza, con sustancias portadoras, excipientes, o estabilizadores fisiológicamente aceptables. Tales materiales son atóxicos a los destinatarios en las posologías y concentraciones empleadas, e incluyen soluciones amortiguadoras tales como TRIS HCl, fosfato, citrato, acetato y sales de ácido orgánico; antioxidantes tales como ácido ascórbico; péptidos de bajo peso molecular (menos de alrededor de diez residuos) tales como poliarginina, proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidinona; aminoácidos tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico, o arginina; monosacáridos, disacáridos, y demás carbohidratos incluyendo celulosa o sus derivados, glucosa, mannosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcares tales como mannitol o sorbitol; iones contrarios tales como sodio y/o surfactantes no iónicos tales como TWEEN, PLURONICS o polietilenglicol.

[0126] Composiciones estériles para inyección pueden formularse de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional como se describe en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (20th ed, Lippincott Williams & Wilkens Publishers (2003)). Por ejemplo, puede desearse la disolución o suspensión del compuesto activo en un vehículo tal como agua o aceite vegetal de ocurrencia natural, como aceite de ajonjolí, maní, o de semilla de algodón o un vehículo graso sintético como oleato de etilo o similares. Pueden incorporarse soluciones amortiguadoras, preservantes, antioxidantes y similares, de acuerdo con la práctica farmacéutica aceptada.

[0127] Ejemplos apropiados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el polipéptido, las cuales matrices están en la forma de artículos moldeados, películas o microcápsulas. Ejemplos matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) como se describe por Langer *et al., J. Boimed Mater. Res.*, (1981) 15:167-277 y Langer, Chem. Tech., (1982) 12:98-105 o alcohol (polivinílico)), poliláctidos (Patente de los Estados Unidos No. 3,773,919,

EP 58,481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman *et al., Biopolymers*, (1983) 22:547-556), acetato de etilen-vinilo no degradable (Langer *et al., supra*), copolímeros degradabels de ácido láctico – ácido glicólico tales como el LUPRON Depot™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico – ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (EP 133,988).

[0128] Aunque polímeros tales como acetato de etilen-vinilo y ácido láctico – ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando proteínas encapsuladas permanecen en el organismo durante un tiempo prolongado, se desnaturalizan o agregan como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, resultando en una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias razonables para la estabilización de la proteína dependiendo del mecanismo involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de un enlace S-S intermolecular a través de intercambio de disulfuro, la estabilización puede lograrse modificando los residuos sulfidrilo, liofilizando de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos adecuados, y desarrollando composiciones específicas de matriz polimérica.

[0129] Las composiciones de liberación sostenida incluyen asimismo preparaciones de cristales del anticuerpo suspendidas en formulaciones apropiadas capaces de mantener cristales en suspensión. Estas preparaciones, cuando se inyectan subcutánea o intraperitonealmente, pueden producir un efecto de liberación sostenida. Otras composiciones incluyen asimismo anticuerpos atrapados en liposomas. Los liposomas que contienen tales anticuerpos se preparan por métodos conocidos *per se*: Patente de los Estados Unidos No. DE 3,218,121; Epstein *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1985) 82: 3688-3692; Hwang *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1980) 77:4030-4034; EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; 142,641; Solicitud de Patente Japonesa 83-118008; Patentes de los Estados Unidos No. 4,485,045 y 4,544,545; y EP 102,324.

células que expresan IGF-I/II o células que sobre-expresan IGF-I/II. Por ejemplo, se contempla que el medicamento posea la propiedad farmacéutica seleccionada del grupo de agentes antimitóticos, alquilantes, antimetabolitos, antiangiogénicos, apoptóticos, alacoides, COX-2, y antibióticos y sus combinaciones. El medicamento puede seleccionarse del grupo de mostazas nitrogenadas, derivados de etilenimina, sulfonatos alquílicos, nitrosoureas, triazenos, análogos de ácido fólico, antraciclinas, taxanos, inhibidores de COX-2, análogos de pirimidina, análogos de purina, antimetabolitos, antibióticos, enzimas, epipodofilotoxinas,complejos de coordinación de platino, alcaloides vinca, ureas sustituidas, derivados de metil hidrazina, supresores adrenocorticoides, antagonistas, endostatina, taxoles, camptotecinas, oxaliplatino, doxorrubicinas y sus análogos, y una combinación de los mismos.

[0138] Ejemplos de toxinas incluyen además gelonina, exotoxina *Pseudomonas* (PE), PE40, PE38, toxina de la difteria, ricina, abrina, toxina α, saporina ribonucleasa (RNasa), DNasa I, enterotoxina A estafilocócica, proteína antivírica de la fitolaca, gelonina, endotoxina *Pseudomonas*, así como sus derivados, combinaciones y modificaciones.

[0139] Ejemplos de radioisótopos incluyen emisores gamma, emisores de positrones, y emisores de rayos X que pueden usarse para localización y/o terapia, y emisores β y emisores α, que pueden emplearse para terapia. Los radioisótopos descritos previamente como útiles para diagnósticos, pronósticos y determinación del estadio clínico son también útiles para terapéuticos. Ejemplos no limitantes de agentes anti-neoplásicos o anti-leucémicos incluyen antraciclinas tales como doxorrubicina (adriamicina), daunorrubicina (daunomicina), idarrubicina, detorrubicina, carminomicina, epirrubicina, esorrubicina, y morfolino y derivados sustituidos, sus combinaciones y modificaciones. Agentes farmacéuticos ejemplares incluyen cis-platino, taxol, caliqueamicina, vincristina, citarabina (Ara-C), ciclofosfamida, prednisona, daunorrubicina, idarrubicina, fludarabina, clorambucil, interferón α, hidroxiurea, temozolomida, talidomida, y bleomicina, y derivados, sus combinaciones y

expresión de IGF-I/II. Preferiblemente un mamífero y, más preferiblemente, un humano, recibe el anticuerpo anti-IGF-I/II.

Combinaciones

[0143] Los anticuerpos anti-IGF-I/II definidos más arriba en el texto pueden aplicarse como terapia única o pueden implicar, además del compuesto de la invención, cirugía o radioterapia o quimioterapia convencional. Tal quimioterapia puede incluir una o más de las siguientes categorías de agentes anti-tumorales:

(i) medicamentos antiproliferativos/antineoplásicos y sus combinaciones, como se emplean en la oncología médica, tales como agentes alquilantes (por ejemplo cis-platino, carboplatino, ciclofosfamida, mostaza nitrogenada, melfalán, clorambucil, busulfán y nitrosoureas); antimetabolitos (por ejemplo antifolatos tales como fluoropirimidinas como 5-fluorouracilo y tegafur, raltitrexed, metotrexato, citarabina e hidroxiurea); antibióticos anti-tumorales (por ejemplo antraciclinas como adriamicina, bleomicina, doxorrubicina, daunomicina, epirrubicina, idarrubicina, mitomicina-C, dactinomicina y mitramicina); agentes antimitóticos (por ejemplo antineoplásicos como vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina y taxoides como taxol y taxotero); e inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo epipodofilotoxinas como etopósido y tenipósido, amsacrina, topotecán, y camptotecina);

(ii) agentes citostáticos tales como antiestrógenos (por ejemplo tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno y yodoxifeno), reguladores por disminución del receptor de estrógeno (por ejemplo, fulvestrant), antiandrógenos (por ejemplo bicalutamida, flutamida, nilutamida y acetato de ciproterona), antagonistas de LHRH o agonistas de LHRH (por ejemplo goserelina, leuprorelina y buserelina), progestógenos (por ejemplo, acetato de megestrol), inhibidores de aromatasa (por ejemplo, anastrozol, letrozol, vorazol y exemestano) e inhibidores de 5α-reductasa tales como finasterida;

(iii) agentes que inhiben la invasión celular del cáncer (por ejemplo, inhibidores de metaloproteinasa como marimastat e inhibidores de la

función de receptor activador de plasminógeno tipo urocinasa);

(iv) inhibidores de la función de factor de crecimiento, por ejemplo tales inhibidores incluyen anticuerpos de factor de crecimiento, anticuerpos de receptor de factor de crecimiento, (por ejemplo el anticuerpo anti-erbb2 trastuzumab [Herceptin™] y el anticuerpo anti-erbb1 cetuximab [C225]), inhibidores de farnesiltransferasa, inhibidores de MEK, inhibidores de tirosina cinasa e inhibidores de serina/treonina cinasa, por ejemplo inhibidores de la familia de factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo inhibidores de la tirosina cinasa de la familia EGFR tales como *N*-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)quinazolin-4-amina (gefitinib, AZD1839), *N*-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)quinazolin-4-amina (erlotinib, OSI-774) y 6-acrilamido-N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-(3-morfolinopropoxi)quinazolin-4-amina (CI 1033)),por ejemplo inhibidores de la familia de factor de crecimiento derivado de plaquetas y, por ejemplo, inhibidores de la familia de factor de crecimiento de hepatocitos;

(v) agentes antiangiogénicos tales como aquellos que inhiben los efectos del factor de crecimiento endotelial vascular, (por ejemplo el anticuerpo de factor de crecimiento celular endotelial anti-vascular bevacizumab [Avastin™], compuestos como los divulgados en las Solicitudes Internacionales de Patente WO 97/22596, WO 97/30035, WO 97/32856 y WO 98/13354) y compuestos que funcionan por otros mecanismos (por ejemplo linomida, inhibidores de la función integrina αvβ3, angiostatina e inhibidores de la acción de angiopoyetinas, por ejemplo la angiopoyetina 1 y la angiopoyetina 2);

(vi) agentes de lesión vascular tales como combretastatina A4 y compuestos divulgados en las Solicitudes Internacionales de Patente WO 99/02166, WO 00/40529, WO 00/41669, WO 01/92224, WO 02/04434 y WO 02/08213;

(vii) genoterapias que pueden desacelerar o detener el crecimiento de células cancerosas (***"antisense therapies"***), por ejemplo aquellas que se dirigen a las dianas enumeradas más arriba, tales como ISIS 2503, una genoterapia complementaria anti-ras;

(viii) métodos de genoterapia, incluidos por ejemplo, métodos para reemplazar genes aberrantes tales como p53 aberrante o BRCA1 o BRCA2 aberrante, métodos GDEPT (terapia con profármacos enzimáticos direccionados por genes) tales como los que usan citosina deaminasa, timidina cinasa o una enzima nitrorreductasa bacteriana y métodos para aumentar la tolerancia del paciente a la quimioterapia o la radioterapia, tales como las genoterapias de resistencia multi-fármaco;

(ix) métodos de inmunoterapia, incluidos por ejemplo métodos *ex-vivo* e *in-vivo* para aumentar la inmunogenicidad de células tumorales en el paciente, tales como transfección con citocinas tales como interleucina 2, interleucina 4 o factor estimulante de colonias macrófago-granulocito, métodos para disminuir la anergia de linfocitos T, métodos que utilizan células inmunitarias transfectadas tales como células dendríticas transfectadas con citocina, métodos que utilizan líneas de células tumorales transfectadas con citosina y métodos que utilizan anticuerpos anti-idiotípicos;

(x) inhibidores del ciclo celular incluidos por ejemplo inhibidores de CDK (por ejemplo flavopiridol) y otros inhibidores de los puntos de control del ciclo celular (por ejemplo cinasa de punto de control); inhibidores de aurora cinasa y otras cinasas involucradas en la regulación de la mitosis y la citoquinesis (por ejemplo quinesinas); e inhibidores de histona deacetilasa;

(xi) antagonistas de endotelina, incluidos antagonistas de endotelina A, antagonistas de endotelina B y antagonistas de endotelina A y B; por ejemplo ZD4054 y ZD1611 (WO 96 40681), atrasentan y YM598; y

(xii) métodos terapéuticos bioterapéuticos por ejemplo aquellos que utilizan péptidos o proteínas (tales como anticuerpos o construcciones de dominio de receptor externo soluble) que o bien secuestran ligandos de receptor, bloquean la unión de ligando a receptor o bien disminuyen la señalización de receptor (por ejemplo debido a una mayor degradación de receptor o niveles de expresión disminuidos).

[0144] Tal tratamiento conjunto puede lograrse mediante la dosificación simultánea, consecutiva o separada de los componentes

individuales del tratamiento. Tales productos de combinación emplean los compuestos de esta invención en el rango posológico descrito más arriba en el texto y el otro agente farmacéuticamente activo en su rango posológico aprobado.

EJEMPLOS

[0145] Los siguientes ejemplos, incluidos los experimentos conducidos, y los resultados alcanzados se proveen con propósitos ilustrativos únicamente y no deben interpretarse como limitantes de las enseñanzas contenidas en esta solicitud.

EJEMPLO 1
Inmunización y Medición de la Concentración

Inmunización

[0146] IGF-I e IGF-II humanos recombinantes obtenidos de R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN Cat. No. 291-G1 y 292-G2 respectivamente) se utilizaron como antígenos. Se desarrollaron anticuerpos monoclonales contra IGF-I/II inmunizando secuencialmente ratones XenoMouse® (cepas XenoMouse XMG2 y XMG4 (cepa 3C-1), Abgenix, Inc. Fremont, CA). Los animales XenoMouse se inmunizaron por la vía del panículo adiposo de la pata para todas las inyecciones. El volumen total de cada inyección fue 50 µl por ratón, 25 µl por panículo adiposo de la pata. Un total de diez (10) ratones se inmunizaron en cada grupo. Cada inyección fue con 10 µg por ratón de IGF-I o IGF-II solo o conjugado con antígeno de hemocianina de lapa (KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin) como portador, como se detalla en la Tabla 2. La primera inyección se completó en volumen en Dulbecco's PBS (DPBS) y se mezcló 1:1 v/v con coadyuvante Titermax Gold (SIGMA Cat. # T2684, lote # K1599). Seguidamente se administraron un total de 8 a 11 refuerzos adicionales durante un período de 27 a 38 días, se mezclaron con 25 µg de Adju-Phos (gel de fosfato de

aluminio, Cat. # 1452-250, lote # 8937, HCl Biosector) y 10 µg CpG (15 µl de coadyuvante de ratón ImmunEasy, Cat. # 303101; lote # 11553042; Qiagen) por ratón, seguido por un refuerzo final de 10 µg de antígeno en DPBS libre de pirógenos, sin coadyuvante. Para inmunización combinada (animales inmunizados con los dos IGF-I e IGF-II), el segundo antígeno se administró en los últimos dos (2) refuerzos.

TABLA 2

RESUMEN DE LA INMUNIZACIÓN

Grupo de Inmunización	Inmunógeno Inicial	Inmunógeno Final	Conjugado KLH	Isotipo de Ratones	Grupo de Fusión
1	IGF-1	IGF-1	-	IgG2-κλ	1
3	IGF-1	IGF-1	-	IgG4-κλ	1
5	IGF-1	IGF-1	+	IgG2-κλ	1
7	IGF-1	IGF-1	+	IgG4-κλ	1
2	IGF-2	IGF-2	-	IgG2-κλ	2
4	IGF-2	IGF-2	-	IgG4-κλ	2
6	IGF-2	IGF-2	+	IgG2-κλ	2
8	IGF-2	IGF-2	+	IgG4-κλ	2
9	IGF-1	IGF-2	-	IgG2-κλ	3
11	IGF-1	IGF-2	-	IgG4-κλ	3
13	IGF-1	IGF-2	+	IgG2-κλ	3
15	IGF-1	IGF-2	+	IgG4-κλ	3
10	IGF-2	IGF-1	-	IgG2-κλ	4
12	IGF-2	IGF-1	-	IgG4-κλ	4
14	IGF-2	IGF-1	+	IgG2-κλ	4
16	IGF-2	IGF-1	+	IgG4-κλ	4

EJEMPLO 2

RECUPERACIÓN DE LINFOCITOS, AISLAMIENTOS DE LINFOCITOS B, FUSIONES Y GENERACIÓN DE HIBRIDOMAS

[0147] Los ratones inmunizados se sacrificaron por dislocación cervical, y los nodos linfáticos de drenaje se recolectaron y se agruparon de cada cohorte. Las células linfoides se disociaron triturando en DMEM para liberar las células de los tejidos y las células se suspendieron en DMEM. Las células se contaron, y se agregaron 0.9 ml DMEM por 100 millones de

linfocitos al sedimento celular para resuspender las células cuidadosa pero completamente. Utilizando 100 µl de microesferas magnéticas CD90+ por 100 millones de células, las células se marcaron incubando las células con las microesferas magnéticas (***"the magnetic beads"***) a 4°C durante 15 minutos. La suspensión de células marcadas magnéticamente, que contenían hasta 10^8 células positivas (o hasta $2x10^9$ células totales), se cargó en una columna LS+ y la columna se lavó con DMEM. Se recogió el efluente total como la función negativa CD90 (se esperaba que la mayoría de estas células fueran linfocitos B).

[0148] La fusión se realizó mezclando linfocitos B enriquecidos lavados de antes y células Ag8.653 de mieloma P3X63 no secretor adquiridas de ATCC, Cat. # CRL 1580 (Kearney et al, J. Immunol. 123, 1979, 1548-1550) en una relación de 1:1. La mezcla de células se sedimentaron cuidadosamente mediante centrifugación a 800 x g. UNa vez retirado completamente el sobrenadante, las células se trataron con 2-4 mL de solución Pronase (CalBiochem, Cat. # 53702; 0.5 mg/ml en PBS) durante no más de 2 minutos. Luego se agregaron 3-5 ml de FBS para detener la actividad enzimática y la suspensión se ajustó a 40 ml de volumen total utilizando solución de electrofusión celular, (ECFS, 0.3M sacarosa, Sigma, Cat. # S7903, 0.1 mM acetato de magnesio, Sigma, Cat. # M2545, 0.1mM acetato de calcio, Sigma, Cat. # C4705). Se retiró el sobrenadante luego de la centrifugación y las células se resuspendieron en 40 ml ECFS. Este paso de lavado se repitió y las células se volvieron a suspender en ECFS a una concentración de $2x10^6$ células/ml.

[0149] Se llevó a cabo electro fusión celular utilizando un generador de fusión (modelo ECM2001, Genetronic, Inc., San Diego, CA). El tamaño de la cámara de fusión empleado fue de 2.0 ml, usando las siguientes configuraciones de instrumentos:

[0150] Condición de alineación: voltaje: 50 V, tiempo: 50 segundos.

[0151] Rotura de la membrana a: voltaje: 3000 V, tiempo: 30 µ segundos

[0152] Tiempo de permanencia pos-fusión: 3 segundos

[0153] Luego de la ECF, las suspensiones de las células se retiraron cuidadosamente de la cámara de fusión bajo condiciones estériles y se transfirieron a un tubo estéril que contenía el mismo volumen de Medio de Cultivo de Hibridoma (DMEM, JRH Biosciences), 15 % FBS (Hyclone), suplementado con L-glutamina, pen/strep, OPI (oxaloacetato, piruvato, insulina bovina) (todos de Sigma) e IL-6 (Boehringer Mannheim). Las células se incubaron durante 15-30 minutos a 37°C, y luego se centrifugaron a 400 x g (1000 rpm) durante cinco minutos. Las células se suspendieron cuidadosamente en un pequeño volumen de Medio de Selección de Hibridoma (Medio de Cultivo de Hibridoma suplementado con 0.5x HA (Sigma, Cat. # A9666)), y se ajustó apropiadamente el volumen con más Medio de Selección de Hibridoma, basado en un recubrimiento final de las placas de $5x10^6$ células B en total por placa de 96 pocillos y 200 µl por pocillo. Las células se mezclaron cuidadosamente y se pipetearon en placas de 96 pocillos y se dejaron crecer. El día 7 ó 10, se retiró la mitad del medio, y las células se volvieron a alimentar con Medio de Selección de Hibridoma.

EJEMPLO 3

SELECCIÓN DE ANTICUERPOS CANDITADOS MEDIANTE ELISA

[0154] Después de 14 días de cultivo, se cribaron los sobrenadantes de hibridoma con respecto a la presencia de anticuerpos monoclonales específicos de IGF-I/II. Las placas ELISA (Fisher, Cat. No. 12-565-136) se recubrieron con 50 µl/pocillo de IGF-I o IGF-II humano (2 µg/ml) en solución amortiguadora de recubrimiento (0.1 M de solución amortiguadora con carbonato, pH 9.6, $NaHCO_3$ 8.4 g/L), luego se incubaron a 4°C de un día para otro. Luego de la incubación, las placas se lavaron con solución amortiguadora de lavado (0.05% Tween 20 en PBS) 3 veces. Se agregaron 200 µl/pocillo de solución amortiguadora de bloqueo (0.5% BSA, 0.1% Tween 20, 0.01% timerosal en lx PBS) y las placas se incubaron a temperatura de la sala durante 1 hora. Luego de la incubación, las placas se

lavaron con solución amortiguadora de lavado tres veces. Se agregaron 50 µl/pocillo de sobrenadantes de hibridoma, y controles positivos y negativos y las placas se incubaron a temperatura de la sala durante 2 horas.

[0155] Luego de la incubación, las placas se lavaron tres veces con solución amortiguadora de lavado. Se agregaron 100 µl/pocillo de anticuerpo de detección en cabra anti-huIgGFc-HRP (Caltag, Cat. No. H10507) y las placas se incubaron a temperatura de la sala durante 1 hora. En un cribado secundario, los positivos en el primer cribado se identificaron selectivamente en dos conjuntos, uno para detección de IgG humana (cadena pesada) y el otro para detección de cadena ligera kappa de Ig humana (anti-hlg kappa-HRP en cabra (Southern Biotechnology, Cat. No. 2060-05) con el fin de demostrar la composición completamente humana para las dos IgG e Ig kappa. Luego de la incubación, las placas se lavaron tres veces con solución amortiguadora de lavado. Se agregaron 100 µl/pocillo de TMB (BioFX Lab. Cat. No. TMSK-0100-01) y las placas se dejaron desarrollar durante alrededor de 10 minutos (hasta que los pocillos de control negativo comenzaron apenas a mostrar color). A continuación se agregaron 50 µl/pocillo de solución de terminación (solución de terminación TMB, (BioFX Lab. Cat. No. STPR-0100-01) y las placas se leyeron en un lector de placas ELISA a 450nm. Como se indica en la Tabla 3, hubo un total de 1.233 pocillos que contenían anticuerpos contra IGF-I y -II.

[0156] Todos los anticuerpos que se unieron en el análisis ELISA se contra-cribaron con respecto a la unión a insulina mediante ELISA con el fin de excluir aquellos que reaccionaron cruzadamente con insulina. Las placas ELISA (Fisher, Cat. No. 12-565-136) se recubrieron con 50 µl/pocillo de insulina recombinante (concentración: 1µg/ml; Sigma, Cat. # 12643) en solución amortiguadora de recubrimiento (0.1 M solución amortiguadora con carbonato, pH 9.6, $NaHCO_3$ 8.4 g/L), luego se incubaron a 4°C de un día para otro. Como se detalla en la Tabla 3, un total de 1.122 anticuerpos de los 1.233 anticuerpos originales reaccionaron cruzadamente con insulina.

TABLA 3. RESUMEN DEL CRIBADO

			Cribado de Confirmación			
Fn #	**Cepa de Ratón**	**Inmunógeno**	**Diana con detección hG**	**Diana con detacción hK+hL**	**IGF-I(+)& IGF-II (+)**	**IGF-I(+) & IGF-II(+) e Insulina (-) humana**
1	G2 KL	IGF-I-KLH	IGF-II	IGF-I	36	28
2	G4 KL	IGF-I-KLH	IGF-II	IGF-I	65	55
3	G2 KL	IGF-II o IGF-II-KLH	IGF-I	IGF-II	168	150
4	G4 KL	IGF-II o IGF-II-KLH	IGF-I	IGF-II	197	194
5	G2 KL	IGF-I/-II-KLH	IGF-II	IGF-II	54	50
6	G4 KL	IGF-I/-II-KLH	IGF-II	IGF-II	101	86
7	G2 KL	IGF-II/-I-KLH	IGF-II	IGF-II	294	271
8	G4 KL	IGF-II/-I o IGF-II/-I-KLH	IGF-II	IGF-II	318	288
		Total F1 a F4			466	427
		Total F5 a F8			767	695
		Total			**1,233**	**1,122**

[0157] Finalmente, los anticuerpos que se seleccionaron en el contra-cribado se analizaron entonces mediante ELISA para confirmar la unión a proteínas IGF-I e IGF-II de ratón. Se identificaron un total de 683 de líneas de hibridoma que tienen reactividad cruzada con IGF-I/II de ratón. En consecuencia, estas líneas de hibridoma expresaron anticuerpos que se unieron a IGF-I humana, IGF-II humana, IGF-I de ratón y IGF-II de ratón, pero no se unieron a insulina humana.

EJEMPLO 4

INHIBICIÓN DE LA UNIÓN DE IGF-I E IGF-II A IGF-IR

[0158] El propósito de este estudio era identificar selectivamente los 683 anticuerpos IgG2 e IgG4 humanos anti-IGF-I/II en la fase del

sobrenadante de hibridoma para neutralizar la actividad, según se determinó por la inhibición de la unión de IGF-I e IGF-II al receptor IGF-IR. Por consiguiente, se realizó un análisis de unión receptor/ligando con células NIH3T3 que sobre-expresan el receptor IGF-IR humano, como se describe más adelante.

[0159] En síntesis, placas de filtración multi-screen (MultiScreen 0.65 μM 96-well PVDF, Millipore, Cat. No. MADV NOB 10) se bloquearon con solución amortiguadora de bloqueo (PBS que contenía 10%BSA con 0.02%NaN_3) con 200μL/pocillo de un día para otro a 4°C. IGF [^{125}I]-marcado (Amersham Life Sciences Cat. No. IM172 (IGF-I) o IM238 (IGF-II)) con 100μCi/ml y 50nM se diluyó a la concentración apropiada (70pM final para IGF-I y 200pM final para IGF-II) en solución amortiguadora de unión (PBS que contenía 2%BSA con 0.02% NaN_3). La placa de filtración recubierta con solución amortiguadora de bloqueo se lavó una vez con 200μL PBS, y 50μL sobrenadantes anti-IGF-I/II Ab (diluidos en solución amortiguadora de unión a 25% del volumen final) se pre-incubaron con 25μL de [^{125}I]-IGF en la placa MultiScreen durante 30-60 minutos sobre hielo. Fibroblastos de ratón NIH3T3 subconfluyentes que expresan de manera estable hIGF-IR (obtenidos de AstraZeneca) se recolectaron con tripsina y se resuspendieron en solución amortiguadora fría de unión con $6x10^6$/ml, y 25μL de células se agregaron a la placa para una incubación de dos horas sobre hielo. La placa se lavó cuatro veces con 200μL de PBS frío y se secó de un día para otro. Se agregaron 25 μL/pocillo de centellante (SuperMix cocktail, Wallac/Perkin Elmer Cat. No. 1200-439) y las placas se leyeron usando un lector Microbeta Trilux (Wallac).

[0160] Se utilizaron los siguientes controles por placa de cribado: no anticuerpo (total IGF ligado), anti-IGF-I neutralizante de control (#05-172, Upstate) o mAbs anti-IGF-II (#MAB292, R&D Systems) con 50μg/ml (fondo no específico) y 0.075 a 0.5μg/ml (valores EC_{50} aproximados de los anticuerpos neutralizantes), y mAbs IgG2 humana de control acoplada con isotipo (PK16.3.1, Abgenix, lote # 360-154) o IgG4 (108.2.1, Abgenix, lote # 718-53A) con una concentración de 0.5μg/ml (valor EC_{50} aproximado de

subsiguientemente contra IGF-I. Un total de 90 líneas fueron capaces de inhibir la unión de IGF-I a su receptor con un límite de integración del 50%. Luego de combinar los aciertos de IgG2 (71) e IgG4 (90), se obtuvieron un total de 161 líneas, las cuales inhibieron IGF-I y IGF-II en 50% o más.

[0165] En conclusión, de los 683 sobrenadantes originales, 343 (111 IgG2 y 232 IgG4, 50.2%) se seleccionaron del primer cribado con uno cualquiera de los dos IGF-I o IGF-II. Se obtuvieron un total de 161 aciertos finales (23.6% de las líneas originales), que fueron capaces de bloquear la unión de los dos IGF-I y IGF-II a IGF-IR con unos criterios de límite de integración total del 50% de inhibición.

TABLA 4. RESUMEN DE CRIBADO DE SOBRENADANTES DE AGOTAMIENTO ANTI-IGF-I/II (50% CUT-OFF)

			Actividad ESN								
Fusión #	Cepa de Ratón	Inmunógeno	hIGF-II con hG^+/hK^+ ó hG^+/hL^+	R/L Análisis de Unión IGF-I	IGF-I+ % Total	R/L Análisis de Unión IGF-II en IGF-I+	IGF-I/II+ % Total	R/L Análisis de Unión IGF-II	IGF-II+ % Total	R/L Análisis de Unión IGF-I en IGF-II+	IGF-I/II+ % Total
1	G2 KL	IGF-I-KLH	14	12	85.7	1	7.1	4	20.0	4	20.0
2	G4 KL	IGF-I-KLH	20								
3	G2 KL	IGF-II ó IGF-II-KLH	49	13	26.5	4	8.2				
4	G4 KL	IGF-II ó IGF-II-KLH	114					86	75.4	36	31.6
5	G2 KL	IGF-I/-II-KLH	32	11	34.4	7	21.9	21	44.7	8	17.0
6	G4 KL	IGF-I/-II-KLH	47								
7	G2 KL	IGF-II/-I-KLH	198	75	37.9	59	29.8				
8	G4 KL	IGF-II/-I ó IGF-II/-I-KLH	209					121	57.9	42	20.1
			683	111 Cut-off 40%	16.3 IgG2	71	10.4	232	34.0 IgG4	90	13.2

EJEMPLO 5

ELISAS DE ANTÍGENO ELEVADO Y ANTÍGENO LIMITADO

[0166] Con el fin de determinar las afinidades relativas entre las 161 líneas de hibridoma seleccionadas en Ejemplo 4, así como la concentración de anticuerpo en los sobrenadantes de cada línea, se llevaron a cabo análisis ELISA de antígeno elevado (HA) y antígeno limitado (LA). En el análisis de cuantificación HA, la elevada concentración de antígeno y la incubación de un día para otro limitan el efecto de la afinidad del anticuerpo, permitiendo la cuantificación de la cantidad relativa de anticuerpo específico de antígeno presente en cada muestra. La baja concentración de antígeno en el análisis LA limita el efecto de la concentración del anticuerpo y resulta en una clasificación de anticuerpos basada en su afinidad relativa.

Análisis de Cuantificación de Antígeno Elevado

[0167] Placas ELISA se recubrieron con cantidades relativamente grandes de uno cualquiera de antígeno IGF-I o IGF-II (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN Cat. No. 291-Gl y 292-G2 respectivamente) a 500ng/ml (67nM). Sobrenadantes de hibridoma que contenían anticuerpo se titularon en un rango de dilución de 1:50 a 1:12200. Se utilizó un control de anticuerpo específico de IGF conocido (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN Cat. No. MAB291 y MAB292 respectivamente) para definir el rango lineal del análisis. Los datos dentro del rango lineal se usaron entonces para derivar la concentración relativa del anticuerpo específico de IGF en cada muestra titulada.

Análisis de Antígeno Limitado

[0168] Placas de microtitulación se recubrieron con bajas concentraciones de antígeno. Cincuenta microlitros (50 µL) de IGF-I o IGF-II a 64, 32, 16, 8, 4, y 2 ng/ml (cubriendo un rango de 8.5 nM a 0.26 nM) en 1% leche descremada / 1X PBS pH 7.4 / 0.5% azida se agregaron a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 30 minutos.

[0169] Las placas se lavaron cuatro veces (4X) con agua, y se agregaron a los pocillos 50μL de sobrenadante de hibridoma que contenía anticuerpos de prueba diluido a 1:25 en 1% de leche descremada / 1X PBS pH 7.4 / 0.5% azida. Las placas se envolvieron herméticamente con película plástica o película de parafina, y se incubaron de un día para otro agitando a temperatura de la sala.

[0170] El día siguiente, todas las placas se lavaron cinco veces (5X) y se agregaron 50 μL de anticuerpo policlonal Fc HRP IgG anti-humana en cabra con una concentración de 0.5 ug/ml en 1% leche descremada, 1X PBS pH 7.4 a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura de la sala.

[0171] Las placas se lavaron por lo menos cinco veces (5X con agua del grifo). Cincuenta microlitros (50) μL de TMB en sustrato HPR se agregaron a cada pocillo, y las placas se incubaron durante 30 minutos. Se detuvo la reacción HRP-TMB agregando 50 μL de 1M de ácido fosfórico a cada pocillo. Se midió la densidad óptica (absorbencia) a 450 nm para cada pocillo de la placa.

Análisis de los Datos

[0172] Se promediaron valores OD de los anticuerpos de prueba y se calculó el rango. Se seleccionaron los anticuerpos con la señal más alta y una desviación estándar aceptablemente baja como los anticuerpos con una mayor afinidad para el anticuerpo que un anticuerpo de referencia.

[0173] Seguidamente se realizó un análisis para seleccionar los principales anticuerpos basándose en neutralización (Ejemplo 4), potencia (baja concentración de anticuerpo, tal como se determinó mediante ELISA HA e inhibición elevada de unión de ligando), afinidad (ELISA LA), o todos los tres criterios. A partir de este análisis, se generó un listado de 25 anticuerpos. Un análisis separado basado en la inhibición % promedio de la unión de IGF-I e -II y de la afinidad para ambos IGF-I e IGF-II generó un segundo listado de 25 anticuerpos. Dieciséis anticuerpos fueron comunes a los dos listados, resultando en un listado final de 40 anticuerpos. Los

resultados HA y LA para estos 40 anticuerpos se resumen en la Tabla 5. Estas 40 líneas se seleccionaron para clonación, de los cuales 33 se clonaron exitosamente.

TABLA 5. RESULTADOS DE ELISA DE ANTÍGENO ELEVADO Y LIMITADO PARA LOS 40 ANTICUERPOS PRINCIPALES

	IGF1 HA		IGF2 HA		IGF1 LA	IGF2 LA	IGF1 LA	IGF2 LA
ID Línea	Promedio (ug/ml) HA1	Dev. Est. HA1	Promedio (ug/ml) HA2	Dev. Est. HA2	IGF1 2ng/ml	IGF2 2ng/ml	IGF1 4ng/ml	IGF2 4ng/ml
4.121	1.16	0.16	3.56	1.34	0.56	0.53	1.14	0.90
4.141	1.99	0.22	1.99	0.21	0.57	0.79	1.25	1.52
4.142	4.70	0.21	3.65	0.31	0.78	1.00	1.76	1.78
4.143	1.74	0.17	2.03	0.41	0.60	0.99	1.20	1.91
4.25	1.26	0.23	1.48	0.36	0.71	0.81	1.31	1.54
4.69	7.17	1.16	6.50	0.53	0.80	0.80	1.50	1.54
4.90	1.15	0.12	3.68	0.77	0.58	0.48	1.04	0.89
7.118	10.34	1.26	10.32	1.90	0.81	0.85	1.56	1.44
7.123	13.4	3.2	12.0	2.8	1.0	1.7	1.66	2.58
7.127	7.28	0.44	6.59	1.55	1.19	1.37	2.29	2.40
7.130	4.32	0.32	3.51	1.34	0.64	1.17	1.36	1.98
7.146	12.04	0.98	9.63	0.6	0.2	0.86	0.29	1.58
7.158	9.29	0.49	7.1	0.56	1.71	1.42	3.00	2.46
7.159	16.53	1.83	41.1		0.56	1.65	0.98	2.47
7.160	4.9	0.5	5.1	0.2	1.7	2.2	3.14	3.30
7.175	8.46	0.49	6.21	1.22	0.13	0.34	0.14	0.62
7.202	11.94	1.98	15.24	1.72	1.11	1.68	2.28	2.69
7.212	11.30	1.90	10.86	1.26	0.97	0.93	2.22	1.54
7.215	10.11	2.05	10.94	1.39	1.01	1.09	2.25	1.93
7.23	4.30	0.26	3.99	0.29	0.55	1.22	1.40	2.17
7.234	4.7	1.4	3.1	0.4	0.7	1.4	1.79	2.44
7.251	3	0.41	1.93	0.17	1.09	1.02	1.31	1.53
7.252	8.25	0.51	5.55	1.68	1.22	1.23	2.53	2.09
7.268	7.58	0.42	5.07	0.92	1.47	1.37	3.06	2.42
7.29	12.5	1.24	23.53	4.7	0.18	0.39	0.27	0.49
7.3	13.18	2.12	8.83	0.58	0.81	1.28	2.07	1.96
7.34	12.54	1.99	14.67	3.05	0.21	1.07	0.44	1.84
7.41	3.69	0.19	4.97	0.8	1.02	1.53	2.21	2.32
7.56	14.6	2.0	21.7	3.7	1.3	1.4	2.38	2.46
7.58	17.52	0.01	27.54	6.22	0.21	1.15	0.47	1.82
7.66	6.02	0.81	6.18	0.71	0.49	0.97	1.42	1.53
7.77	8.42	0.18	7.25	1.12	0.64	0.46	1.50	1.00
7.85	22.67	0.68	23.63	0.93	0.1	0.33	0.16	0.51
7.99	7.9	0.2	5.9	1.6	0.9	1.0	1.87	1.65
8.119	1.26	0.00	0.77	0.16	2.37	0.79	3.77	1.36
8.141	5.96	0.50	4.12	0.61	1.80	0.61	3.02	1.08
8.146	4.03	0.45	2.55	0.74	0.97	1.06	2.13	1.98
8.287	4.8	0.1	2.8	0.8	2.2	1.6	3.80	2.91

	IGF1 HA		IGF2 HA		IGF1 LA	IGF2 LA	IGF1 LA	IGF2 LA
ID Línea	Promedio (ug/ml) HA1	Dev. Est. HA1	Promedio (ug/ml) HA2	Dev. Est. HA2	IGF1 2ng/ml	IGF2 2ng/ml	IGF1 4ng/ml	IGF2 4ng/ml
8.8	2.00	0.17	1.45	0.25	1.72	0.77	3.13	1.46
8.86	3.15	0.19	2.36	0.24	0.92	1.35	1.76	2.18

EJEMPLO 6

UNIÓN DE ANTICUERPOS A IGF-I E IGF-II LIGADO A IGFBP-3

[0174] IGF-I e -II circulan en el suero, ligados la mayoría de las veces a proteínas de unión IGF (IGFBPs). Un objetivo era identificar anticuerpos que no reconocen IGFs en complejo con IGFBPs, con el fin de evitar el agotamiento *in vivo* de anticuerpos anti-IGF. El siguiente formato de análisis se desarrolló para la caracterización de anticuerpos que reconocen IGF-I o IGF-II cuando estos factores de crecimiento se acomplejan con IGFBP-3. Específicamente, este análisis probó la capacidad de IGF en complejos IGF/anticuerpo anti-IGF de unirse a IGFBP-3.

Bloqueo Mediado por Anticuerpo de la Captura de IGF por IGFBP-3

[0175] Se desarrolló un análisis en donde se pre-formaron complejos entre IGF-I o IGF-II y anticuerpos específicos de IGF de los ejemplos ya mencionados. Se probó la capacidad de estos complejos de unirse a IGFBP-3 utilizando tecnología de análisis AlphaScreen (PerkinElmer). En una placa de 384 pocillos, 10 µL de sobrenadantes de hibridoma diluidos 1:20 se mezclaron con 10 µL de 3 nM de IGF-I o IGF-II biotinilados y se incubaron a temperatura de la sala durante 2 horas. Se agregaron microesferas donadoras AlphaScreen recubiertas con avidina y microesferas aceptoras AlphaScreen acopladas a IGFBP-3 (10 µL de una mezcla, para una dilución final 1/60 de los sobrenadantes de hibridoma), y la incubación se continuó por una hora más. A continuación se leyeron muestras en un lector de placas Packard Fusion.

[0176] Tres anticuerpos monoclonales anti-IGF M23 disponibles en el comercio (Cell Sciences), 05-172 (Upstate) y MAB291 (R&D Systems)

mostraron diferentes capacidades de inhibir la unión de IGF a IGFBP con valores IC_{50} que variaban desde ng/mL bajos a 100 ng/mL. No se observó inhibición de la unión IGF-I a las IGFBP-3 con IgG irrelevante de ratón y IgG humana hasta 10 μg/mL, sugiriendo que el efecto anti-IGF-I es específico. Anticuerpos monoclonales 05-166 disponibles en el comercio (Upstate) y MAB292 (R&D) mostraron una diferencia significativa en afinidad para la inhibición de las interacciones IGF-II / IGFBP-3. Estos experimentos muestran que mAbs anti-IGF pueden bloquear la unión de IGF a IGFBP-3, dando un análisis que podría usarse para cribar anticuerpos purificados de líneas de hibridoma. El siguiente paso fue evaluar los efectos de medio de hibridoma agotado sobre la señal de análisis.

[0177] Diluciones en serie de medio de hibridoma y sobrenadantes de hibridoma anti-KLH se probaron en el sistema de análisis. Cuando sobrenadantes de hibridoma se diluyeron 1:10 en una preparación para pre-incubación con IGFI/I1 (la dilución final en el análisis fue 1:60), casi no hubo efecto del medio sobre los resultados del análisis. Basados en estos datos, sobrenadantes de hibridoma se diluyeron para pre-incubación con IGF, proporcionando la dilución 1/60 final preferida en el análisis.

[0178] Seiscientos ochenta y tres sobrenadantes de agotamiento positivos para unión IGF-I e IGF-II se examinaron con respecto a su capacidad de inhibir la unión de IGF a IGFBP-3. La inhibición por encima del 50% para IGF-I y por encima de 60% para IGF-II se utilizaron como criterios de límite de integración. Los resultados resumidos del cribado utilizando estos límites de integración se muestran en la Tabla 6.

TABLA 6. NÚMEROS DE ACIERTOS POSITIVOS IDENTIFICADOS EN EL CRIBADO

		IGF-I	IGF-II	IGF-I/II
Muestras	Inhibición->	>50%	>60%	
376	(placas 1-4)	48	51	19
307	(placas 5-8)	39	78	32
683	Total	87	129	51

[0179] El análisis de competición IGFBP usando el análisis AlphaScreen identificó 87 muestras que inhibieron la unión de IGF-I a IGFBP-3 y 129 muestras que inhibieron la unión de IGF-II a IGFBP-3 entre 683 sobrenadantes probados. Cincuenta y una muestras demostraron competición doble de IGF-I y IGF-I1. No obstante, con el fin de reproducir más cuidadosamente la función o comportamiento de los anticuerpos *in vivo*, donde se preformarían ampliamente el IGF y el complejo IGFBP, se realizaron análisis adicionales, como se describe en el Ejemplo 8.

EJEMPLO 7

DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD DE LOS ANTICUERPOS ANTI-IGF-I E IGF-II USANDO ANÁLISIS BIACORB (CRIBADO DE BAJA RESOLUCIÓN)

Cribado de Baja Resolución de 34 Anticuerpos Monoclonales Purificados

[0180] La resonancia de plasmón superficial sin etiqueta (SPR), o Biacore, se utilizó para medir la afinidad del anticuerpo al antígeno. Para este propósito, se preparó una superficie de anticuerpo anti-humano en cabra de alta densidad sobre un chip CM5 Biacore utilizando acoplamiento rutinario de amina. Todos los mAbs se diluyeron a aproximadamente 20 µg/ml en solución amortiguadora de electroforesis HBS-P que contenía 100 µg/ml BSA. Se capturó cada mAb en una superficie separada empleando un tiempo de contacto de 30 segundos con 10 µL/min., y un lavado de 5 minutos para estabilización de la línea de referencia mAb.

[0181] IGF-I se inyectó a 335.3 nM en todas las superficies a 23°C durante 120 segundos, seguido por una disociación de 5 minutos, usando un caudal de 100 µL/min. Las muestras se prepararon en la solución amortiguadora de electroforesis HBS-P descrita anteriormente. Se regeneraron las superficies después de cada ciclo de captura/inyección con

un pulso de 15 segundos de 146mM de ácido fosfórico (pH 1.5). Los mismos ciclos de captura/inyección se repitieron para cada anticuerpo con 114.7 nM IGF-II. Se prepararon datos de unión corregidos por desviación para los 34 mAbs restando la señal de una célula de flujo de control y restando la desviación de línea de referencia de una solución amortiguadora inyectada justo antes de cada inyección de antígeno. Los datos se ajustaron globalmente a un modelo de interacción 1:1 utilizando CLAMP para determinar la cinética de unión (David G. Myszka and Thomas Morton (1998) "CLAMP©: a biosensor kinetic data analysis program," TIBS 23, 149-150). Se usó un coeficiente de transporte de masa en el ajuste de los datos. Los resultados del análisis cinético de la unión de IGF-I e IGF-II a 25°C se resumen en la siguiente Tabla 7. Los mAbs se clasifican desde la afinidad máxima a la mínima.

TABLA 7. CRIBADO BIACORE DE BAJA RESOLUCIÓN DE IGF-I E IGF-II DE 34 ANTICUERPOS MONOCLONALES

	IGF-II			IGF-I		
Muestra	**$k_a(M^{-1}s^{-1})$**	**k_d (s^{-1})**	**K_D(pM)**	**$K_a(M^{-1}s^{-1})$**	**k_d (s^{-1})**	**K_D(pM)**
7.159.2	3.5×10^6	1.0×10^{-5}*	2.9	4.3×10^6	9.3×10^{-4}	216.0
8.86.1	6.1×10^6	2.4×10^{-4}	39.3	3.4×10^6	1.3×10^{-2}	3823.0
4.25.1	9.3×10^6	4.1×10^{-4}	44.1	5.1×10^6	6.9×10^{-3}	1353.0
7.234.2	6.4×10^6	2.9×10^{-4}	45.3	6.7×10^6	2.2×10^{-3}	328.0
7.160.2	4.6×10^6	2.5×10^{-4}	54.3	5.6×10^6	3.3×10^{-3}	589.0
7.146.3	3.2×10^6	1.8×10^{-4}	56.2	3.8×10^6	8.7×10^{-3}	2289.0
7.34.1	3.0×10^6	1.8×10^{-4}	60.0	5.2×10^6	3.2×10^{-3}	615.0
7.123.1	4.0×10^6	3.4×10^{-4}	85.0	4.3×10^6	9.0×10^{-3}	2093.0
7.202.3	1.8×10^6	1.7×10^{-4}	94.4	1.2×10^6	5.4×10^{-3}	4500.0
4.141.1	4.9×10^6	4.7×10^{-4}	95.9	*	*	*
7.215.2	3.2×10^6	3.3×10^{-4}	103.0	3.6×10^6	2.6×10^{-2}	7222.0
8.287.2	2.4×10^6	2.5×10^{-4}	104.0	7.7×10^5	1.3×10^{-3}	1688.0
8.146.2	7.7×10^6	8.0×10^{-4}	104.0	2.4×10^6	1.3×10^{-2}	5417.0
4.143.2	1.1×10^7	1.2×10^{-3}	109.0	6.4×10^6	1.9×10^{-2}	2969.0
7.251.3	3.5×10^6	4.3×10^{-4}	123.0	4.6×10^6	4.3×10^{-3}	935.0
7.99.1	6.9×10^6	9.9×10^{-4}	143.0	6.0×10^6	4.8×10^{-3}	800.0
4.142.2	5.3×10^6	8.5×10^{-4}	160.0	8.5×10^6	1.9×10^{-2}	2235.0

	IGF-II			IGF-I		
Muestra	$k_a(M^{-1}s^{-1})$	$k_d(s^{-1})$	K_D(pM)	$K_a(M^{-1}s^{-1})$	$k_d(s^{-1})$	K_D(pM)
7.41.3	3.2×10^6	5.5×10^{-4}	172.0	5.2×10^6	2.9×10^{-3}	558.0
7.56.3	3.3×10^6	6.0×10^{-4}	182.0	4.8×10^6	3.1×10^{-3}	646.0
7.127.1	4.1×10^6	7.6×10^{4}	185.0	4.9×10^6	3.5×10^{-3}	714.0
8.8.3	4.0×10^6	7.8×10^{-4}	195.0	3.1×10^6	8.2×10^{-4}	264.0
7.158.2	3.4×10^6	6.7×10^{4}	197.0	4.4×10^6	2.2×10^{-3}	500.0
7.23.3	3.3×10^6	6.5×10^{-4}	197.0	4.1×10^6	5.8×10^{-3}	1415.0
7.252.1	3.2×10^6	6.5×10^{-4}	203.0	2.3×10^6	2.1×10^{-3}	913.0
7.66.1	3.6×10^6	7.7×10^{-4}	214.0	2.0×10^6	2.5×10^{-3}	1250.0
7.130.1	4.2×10^6	1.0×10^{-3}	238.0	4.6×10^6	1.8×10^{-2}	3913.0
4.90.2	4.9×10^6	1.2×10^{-3}	245.0	*	*	*
7.3.3	3.2×10^6	8.8×10^{-4}	275.0	4.1×10^6	3.9×10^{-3}	951.0
7.118.1	4.6×10^6	1.5×10^{3}	326.0	5.6×10^6	5.1×10^{-3}	911.0
7.212.1	4.2×10^6	1.6×10^{3}	381.0	3.1×10^6	6.0×10^{-3}	1935.0
7.175.2	1.3×10^6	7.4×10^{-4}	569.0	1.8×10^6	2.0×10^{-2}	11111.0
4.121.1	5.5×10^{6}*	3.2×10^{-3}*	582.0*	1.5×10^6	2.1×10^{-3}	1400.0
7.85.2	1.9×10^6	1.3×10^{-3}	684.0	2.2×10^6	2.9×10^{-2}	13182.0
7.58.3	8.9×10^6	7.9×10^{-3}	888.0	7.2×10^6	3.2×10^{-2}	4444.0

Datos de Unión de IGF-I

[0182] La mayoría de los mAbs se ajustan a un modelo 1:1 razonablemente bien. Los mAbs 4.90.2 y 4.141.1 se caracterizaron por datos extremadamente complejos. Estos mAbs se identificaron con un asterisco en la Tabla 7 porque no pudieron calcularse constantes cinéticas significativas del ajuste del modelo 1:1. La última fase de disociación (***"off-rate phase"***) parece ser muy lenta para estos dos mAbs (por lo menos 1 X 10^{-5} s^{-1}), lo cual podría hacer estos dos mAbs útiles como compuestos terapéuticos.

Datos de Unión de IGF-II

[0183] La mayoría de los mAbs se ajustan a un modelo 1:1 razonablemente bien. La disociación para mAb 7.159.2 se mantuvo constante a 1 X 10^{-5} s^{-5} porque no hubo suficientes datos de deterioro para

calcular adecuadamente k_d.

[0184] Los estudios BiaCore de baja resolución en este ejemplo se diseñan como un método de clasificación semi-cuantitativa. Con el fin de obtener una información más exacta con respecto a las constantes y afinidades de asociación características de mAbs individuales, se llevaron a cabo estudios BiaCore de alta resolución, como se describe en el Ejemplo 8.

EJEMPLO 8

DETERMINACIÓN DE AFINIDAD DE LOS ANTICUERPOS ANTI-IGF-I Y IGF-II USANDO ANÁLISIS BIACORE (CRIBADO DE ALTA RESOLUCIÓN)

[0185] Se realizó un análisis de alta resolución para medir la afinidad de los anticuerpos al antígeno. mAbs 7.159.2, 7.234.2, 7.34.1, 7.251.3, y 7.160.2 se capturaron cada uno y los antígenos IGF-I e IGF-II se inyectaron cada uno en un rango de concentraciones. Las constantes de unión resultantes se relacionan en la Tabla 8.

TABLA 8. AFINIDAD DE LOS ANTICUERPOS ANTI-IGF DETERMINADA POR ANÁLISIS BIACORE DE ALTA Y BAJA RESOLUCIÓN

mAb	**Baja resolución K_D (pM)**		**Alta resolución K_D (pM)**	
	IGF-I	**IGF-II**	**IGF-I**	**IGF-II**
7.159.2	216.0	2.9	294.0	1.9
7.234.2	328.0	45.3	3760.0	295.0
7.34.1	615.0	60.0	436.0 421.0	164.0 162.0
7.251.3	935.0	123.0	452.0	47.4
7.160.2	589.0	54.3	2800.0	237.0

[0186] Por lo tanto, incorporaciones de la invención pueden incluir una anticuerpo que preferencialmente se unirá a IGF-II, pero que reaccionará cruzadamente con IGF-I, uniéndose a IGF-II con afinidad más

elevada que a IGF-I. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a IGF-II con una afinidad 2.5 veces mayor que a IGF-I. En ciertas incorporaciones, el anticuerpo puede unirse a IGF-II con una afinidad por lo menos 5, por lo menos 10, por lo menos 25, por lo menos 50 o por lo menos 150 veces más grande que a IGF-I.

Cribado de Complejos IGF-I/GFBP-3 Preformados

[0187] El análisis de competición IGFBP descrito en Ejemplo 6 identificó 87 muestras que inhibieron la unión de IGF-I a IGFBP-3 y 129 muestras que inhibieron la unión de IGF-II a IGFBP-3 entre 683 sobranadantes probados. Cincuenta y una muestras demostraron competición doble de IGF-I e IGF-II. Sin embargo, con el fin de reproducir más cuidadosamente la función o comportamiento de los anticuerpos *in vivo,* donde el complejo IGF y IGFBP se pre-formaría más ampliamente, se realizaron los siguientes análisis Biacore e anticuerpos seleccionados.

[0188] Seis anticuerpos seleccionados se identificaron selectivamente para determinar si se unen a IGF-I o IGF-II en complejo con IGFBP. Todos los seis mAbs seleccionados (7.159.2, 7.146.3, 7.34.1, 7.251.3, 7.58.3, y el anticuerpo de control no relacionado ABX-MA1) se inmovilizaron covalentemente con una elevada capacidad de superficie (5.400-12,800 RUs) en dos chips Biacore CM5 utilizando acoplamiento rutinario de amina con un instrumento Biacore 2000. Se activó una celda de flujo en cada chip CM5 y se bloqueó (no se inmovilizó mAb) para uso como superficie de control.

[0189] A continuación, se mezclaron entre sí IGF-I e IGFBP-3 en solución salina amortiguada con Hepes, pH 7.4, 0.005% P-20, 100 ug/ml BSA (HBS-P) para hacer una solución final de 193 nM y 454 nM, respectivamente. IGF-II e IGFBP-3 se mezclaron entre sí para preparar una solución final de 192 nM y 455 nM, respectivamente. Bajo estas condiciones, IGF-I e IGF-II se acomplejaron 99.97% por IGFBP-3. Bajo estas condiciones se alcanzó el equilibrio en minutos. Soluciones de 1GF-1/IGFBP-3 e IGF-N/IGFBP-3 acomplejados fluyeron a través de las varias

superficies de los mAb a 40 µL/min y 23 °C, durante 180 segundos y se siguió la disociación durante 120 segundos. El IGF-I e IGF-II no acomplejados se hicieron fluir entonces a través de cada superficie a 193 nM y 192 nM, respectivamente, y se hizo fluir IGFBP-3 a través de cada superficie a 454 nM. Las superficies se regeneraron con un pulso de 20 segundos de 10 mM glicina, pH 2.0.

[0190] Los sensogramas se procesaron utilizando el programa Scrubber, restando la variación total del índice refractivo y cualquier señal de unión no específica del analito a la superficie de control ("***the blank surface***") de la señal de unión de las superficies con mAb inmovilizado. Luego de la resta de corrección del control, los sensogramas se referenciaron una segunda vez restando un sensograma promedio para inyecciones de solución amortiguadora sobre una celda de flujo específica. Esta "doble referencia" corrigió los sensogramas de unión de mAb con respecto a cualesquiera errores sistemáticos presentes en una celda de flujo particular.

[0191] IGF-I/IGFBP-3 e IGF-II/IGFBP-3 acomplejados y no acomplejados se ligaron débilmente a los anticuerpos ligados, siendo un cálculo aproximado de la interacción de unión no específica K_D>1 µM para todos los seis mAbs, incluido el control negativo ABX-MA1 (véase Tabla 9). No obstante, con ABX-MA1 la unión de IGF-I/II fue débil e indicó interacciones de unión no específica ocurridas con todos estos tres analitos. Aparentemente, los complejos IGF/IGFBP-3 se unen ligeramente más fuertemente a todos estos mAbs que IGFBP-3 solo. Sin embargo, como los dos IGF-I, 1GF-II y IGBP-3 parecen unirse no específicamente a estos mAbs por sí mismos, cuando ambos se ligan entre sí, esto resulta en un complejo de proteína de unión no específica aún "más pegajoso", que explica la mayor señal de unión para el complejo. Los complejos IGF-I/II/IGFBP-3 e IGFBP-3 se ligaron a la superficie de control significativamente, indicando además la no especificidad de estas dos proteínas. No obstante, en los siguientes sensogramas esta unión de fondo se resta en la primera referencia durante el procesamiento de los datos,

como se describe anteriormente.

[0192] Este experimento sugiere que, aunque 51 de las muestras mostraron previamente que inhibían la unión de IGF-I/II a IGFBP3 (Ejemplo 6), los anticuerpos se unen igualmente al complejo IGF/IGFBP *in vitro.*

TABLA 9. RESUMEN PARA LA UNIÓN DE IGF-I/IGFBP-3 E IGF-II/IGFBP-3 A SEIS MABS.

mAb	Complejo IGF-I/IGFBP-3	Complejo IGF-II/IGFBP-3	IGFBP-3	IGF-I (o II)
7.159.2	+	+	+	+++
7.146.3	+	++	+	+++
7.34.1	+	++	+	+++
7.251.3	++	++	++	+++
7.58.3	++	++	++	+++
ABX-MA1	+	+	+	+

+, unión leve, relativa a la unión IGF-I o IGF-II, al mAb

++, unión media, relativa a la unión IGF-I o IGF-II, al mAb

+++, unión fuerte, relativa a la unión IGF-I o IGF-II, al mAb

*Estas calificaciones NO indican la K_D para estas interacciones.

EJEMPLO 9

DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD DEL ANTICUERPO ANTI-INSULINA USANDO ANÁLISIS BIACORE (CRIBADO DE BAJA RESOLUCIÓN)

[0193] La reactividad cruzada de anticuerpos a IGF-I/II se investigó aún más midiendo la afinidad del mAbs a la insulina humana. Anticuerpos IGF-I/II se inmovilizaron en los chips CM5 Biacore, y se inyectó insulina en solución para la determinación de la asociación y disociación (***"the on-rate and off-rate"***). Cinco mAbs, incluidos 7.234.2, 7.34.1, 7.159.2, 7.160.2, y 7.251.3, se probaron en este experimento. Insulina diluida a 502 nM en la solución amortiguadora de electroforesis se inyectó sobre todas las

superficies de captura.

[0194] No se observó unión de insulina a ninguno de los mAbs a 502 nM insulina. Estos resultados sugieren que no hay reactividad cruzada aparente de los mAbs IGF-I/II con insulina.

EJEMPLO 10

UNIÓN DE ANTICUERPOS

[0195] Se realizó unión de epítopo para determinar cuáles de los anticuerpos anti-IGF-I/II competirían cruzadamente entre sí y, en consecuencia, tenderían a unirse al mismo epítopo en IGF-I/II. El proceso de unión se describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos 20030175760, también descrito en Jia *et al.*, J. Immunol. Methods, (2004) 288:91-98, las cuales se incorporan ambas por referencia en su totalidad. En síntesis, microesferas Luminex se acoplaron con anti-huIgG de ratón (Pharmingen #555784) siguiendo el protocolo de acoplamiento de proteína suministrado en el sitio de Internet de Luminex. Microesferas pre-acopladas se prepararon para acoplamiento a un anticuerpo desconocido primario utilizando el siguiente procedimiento, protegiendo las microcápsulas de la luz. Para cada sobrenadante desconocido se emplearon tubos individuales. El volumen de sobrenadante necesario se calculó usando la siguiente fórmula: (nX2+10) x 50 µl (donde n = número total de muestras). En este análisis se empleó una concentración de 0.1 µg/ml. Todas las microesferas (***"the bead stock"***) se homogeneizaron suavemente, y se diluyeron en sobrenadante a una concentración de 2.500 de cada microesfera en 50 µl por pocillo o $0.5X10^5$ microesferas/ml.

[0196] Se incubaron muestras en un agitador en lo oscuro a temperatura de la sala de un día para otro.

[0197] La placa filtrante se pre-humedeció agregando 200 µl de solución amortiguadora de lavado por pocillo, la cual se aspiró a continuación. Se agregaron 50 µl de cada microesfera a cada pocillo de la placa filtrante. Se lavaron las muestras una vez agregando 100 µl/pocillo de solución amortiguadora de lavado, aspirando al mismo tiempo. Se

agregaron antígeno y controles a la placa filtrante a 50 µl/pocillo. Se cubrió la placa, se incubó en la oscuridad durante 1 hora en un agitador, y luego las muestras se lavaron 3 veces. En seguida se agregó un anticuerpo desconocido secundario a 50 µl/pocillo. Se utilizó una concentración de 0.1 µg/ml para el anticuerpo primario. La placa se incubó luego en lo oscuro durante 2 horas a temperatura de la sala en un agitador, y a continuación las muestras se lavaron 3 veces. Se agregaron 50 µl/pocillo de IgG anti-humana de ratón biotinilada (Pharmingen #555785) diluidos a 1:500, y las muestras se incubaron en lo oscuro durante 1 hora, agitando al mismo tiempo a temperatura de la sala.

[0198] Las muestras se lavaron 3 veces. Se agregaron 50 µl/pocillo de estreptavidina-PE con una dilución 1:1.000, y las muestras se incubaron en lo oscuro durante 15 minutos agitando al mismo tiempo a temperatura de la sala. Luego de realizar dos ciclos de lavado en el Luminex100, las muestras se lavaron 3 veces. El contenido en cada pocillo se resuspendió en 80 µl de solución amortiguadora de bloqueo. Las muestras se mezclaron cuidadosamente pipeteando varias veces para resuspender las microesferas. Seguidamente las muestras se analizaron en el Luminex100. Los resultados se presentan a continuación en la Tabla 10.

TABLA 10. UNIONES PARA LOS 34 ANTICUERPOS IGF-I/II PRINCIPALES POSITIVOS EN EL ANÁLISIS FUNCIONAL

IGF-I			
Unión 1	**Unión 2**	**Unión 3**	**No Unión**
7.3.3	7.58.3	7.175.2	7.215.2
7.23.3	8.287.2	7.85.2	
7.66.1		4.90.2	
7.56.3		4.141.1	
7.160.2		7.146.3	
7.41.3		7.34.1	
4.121.1		7.159.2	
8.146.2		7.251.3	
7.252.1			
7.123.1			
7.212.1			
7.234.2			
7.99.1			
7.127.1			
4.25.1			
8.8.3			
7.158.2			
7.202.3			
7.130.1			
8.86.1			
4.142.2			
7.118.1			
4.143.2			

IGF-II			
Unión 1	**Unión 2**	**Unión 3**	**No Unión**
7.3.3	7.158.2	7.175.2	7.215.2
7.127.1	8.146.2	4.90.2	
7.99.1	7.252.1	4.141.1	
7.123.1	8.86.1	7.85.2	
7.212.1		7.251.3	
7.234.2		7.159.2	
7.130.1		7.146.3	
7.118.1		7.34.1	
8.287.2			
7.58.3			
7.66.1			
7.41.3			
7.56.3			
7.160.2			
7.202.3			
8.8.3			
4.25.1			
7.23.3			
4.142.2			
4.143.2			
4.121.1			

EJEMPLO 11

ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE ANTICUERPOS ANTI-IGF-I/II

[0199] Las cadenas pesadas variables y las cadenas ligeras variables de varios anticuerpos se secuenciaron para determinar sus secuencias de ADN. La información de secuencias completas para los anticuerpos anti-IGF-I/II se provee en el listado de secuencias con secuencias de nucleótidos y aminoácidos para cada combinación de cadenas gamma y kappa. Las secuencias pesadas variables se analizaron para determinar la familia VH, la secuencia de la región D y la secuencia de la región J. Las secuencias se tradujeron luego para determinar la secuencia de aminoácidos primaria y se

compararon con la línea germinal VH, las secuencias de la región D y J para evaluar hipermutaciones somáticas.

[0200] La alineación de las secuencias de estos anticuerpos a sus genes de línea germinal se muestra en las siguientes tablas. Tabla 11 es una tabla que compara las regiones de cadena pesada del anticuerpo a su región de cadena pesada de línea germinal afín. Tabla 12 es una tabla que compara las regiones de cadena ligera kappa del anticuerpo a su región de cadena ligera de línea germinal afín. Mutaciones alejadas de la línea germinal se muestran como el nuevo aminoácido.

[0201] Las regiones variables (V) de las cadenas de inmunoglobulina se codifican por múltiples segmentos de ADN de línea germinal, los cuales se unen en regiones variables funcionales (V_HDJ_H o V_KJ_K) durante la ontogenia de los linfocitos B. Se estudiaron en detalle la diversidad genética y molecular de la respuesta del anticuerpo a IGF-I/II. Estos análisis revelaron varios puntos específicos a los anticuerpos anti-IGF-I/II.

[0202] Análisis de cinco anticuerpos individuales específicos a IGF-I/II resultaron en la determinación de que los anticuerpos se derivaron de tres genes VH de línea germinal diferentes, cuatro de ellos de la familia VH4, derivándose 2 anticuerpos del segmento del gen VH4-39. Las Tablas 11 y 12 muestran los resultados de este análisis.

[0203] Debe observarse que las secuencias de aminoácidos entre los clones hermanos recolectados de cada hibridoma son idénticas. Por ejemplo, las secuencias de cadena ligera y cadena pesada para mAb 7.159.2 son idénticas a las secuencias mostradas en la Tablas 11 y 12 para el mAb 7.159.1.

[0204] Las CDR1s de cadena pesada de los anticuerpos de la invención tienen una secuencia como se divulga en la Tabla 11. Las CDR1s divulgadas en la Tabla 11 son de la definición de Kabat. Alternativamente, las CDR1s pueden definirse utilizando una definición alternativa, con el fin de incluir los últimos cinco residuos de la secuencia FR1. Por ejemplo, para el anticuerpo 7.159.1 la secuencia FR1 es QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS (SEQ ID NO.: 93) y la secuencia

de CDR1 es GYTFTSYDIN (SEQ ID NO.: 94); para el anticuerpo 7.158.1 la secuencia FR1 es QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS (SEQ ID NO.: 95) y la secuencia CDR1 es GGSIRSSSYYWG (SEQ ID NO.: 96); para el anticuerpo 7.234.1 la secuencia FR1 es QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS (SEQ ID NO.: 97) y la secuencia CDR1 es GGSINSSSNYWG (SEQ ID NO.: 98); para el anticuerpo 7.34.1 la secuencia FR1 es QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS (SEQ ID NO.: 99) y la secuencia CDR1 es GGSISSYYWS (SEQ ID NO.: 100); y para el anticuerpo 7.251.3 la secuencia FR1 es QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVS (SEQ ID NO.: 101) y la secuencia CDR1 es GGSISSYYWS (SEQ ID NO.: 102).

[0205] Debe observarse que, donde un anticuerpo particular difiere de su secuencia de línea germinal respectiva en el nivel de aminoácidos, la secuencia del anticuerpo puede retro-mutarse a la secuencia de línea germinal. Tales mutaciones correctivas pueden ocurrir en una, dos, tres o más posiciones, o una a combinación de cualquiera de las posiciones mutadas, empleando técnicas estándar de biología molecular. A modo de ejemplo no limitante, Tabla 12 muestra que la secuencia de cadena ligera de mAb 7.34.1 (SEQ ID NO.: 12) difiere de la secuencia de línea germinal correspondiente (SEQ ID NO.:80) en una mutación Pro a Ala (mutación 1) en la región FR1, y por una mutación Phe a Leu (mutación 2) en la región FR2. Por lo tanto, la secuencia de nucleótidos o aminoácidos que codifica la cadena ligera de mAb 7.34.1 puede modificarse para cambiar la mutación 1 con el fin de producir la secuencia de línea germinal en el sitio de mutación 1. Además la secuencia de nucleótidos o aminoácidos que codifica la cadena ligera de mAb 7.34.1 puede modificarse para cambiar la mutación 2 con el fin de producir la secuencia de línea germinal en el sitio de mutación 2. Aún más, la secuencia de nucleótidos o aminoácidos que codifica la cadena ligera de mAb 7.34.1 puede modificarse para cambiar la mutación 1 y la mutación 2 con el fin de producir la secuencia de línea germinal en los sitios de las dos mutaciones 1 y 2.

TABLA 11. ANÁLISIS DE CADENA PESADA

Nombre de la Cadena	SEQ ID NO.	V	D	J	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Línea Germinal**	75	VH1-8	N.A.	JH6B	QVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYTFT	SYDI N	WVRQATG QGLEWMG	WMNPNSGNT GYAQKFQG	RVTMTRNTSISTAYMELS SLRSEDTAVYYCAR	##YYYYY GMDV	WGQGTT VTVSSA
7_159_1	6	"	"	"	QVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCKASGYTFT	SYDI N	WVRQATG QGLEWMG	WMNPNSGNT GYAQKFQG	RVTMTRNTSISTAYMELS SLRSEDTAVYYCAR	DPYYYYY GMDV	WGQGTT VTVSSA
Línea Germinal	77	VH4-39	D6-19	JH2	QLQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSGGSIS	SSSY YWG	WIRQPPG KGLEWIG	SIYYSGSTY YNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCAR	####SS# #WYFDL	WGRGTL VTVSSA
7_158_1	2	"	"	"	QLQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSGGSIR	SSSY YWG	WIRQPPG KGLEWIG	GIYYSGSTY YNPSLKS	RVTMSVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCAR	QRGHSSG WWYFDL	WGRGTL VTVSSA
7_234_1	18	"	"	"	QLQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSGGSIN	SSSN YWG	WIRQPPG KGLAWIG	GIYYSGSTY YNPSLRS	RVTMSVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCAR	QRGHSSG WWYFDL	WGRGTL VTVSSA
Línea Germinal	79	VH4-59	D1-20	JH6B	QVQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSGGSIS	SYYW S	WIRQPPG KGLEWIG	YIYYSGSTN YNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCA#R	ITGT### GMDV	WGQGTT VTVSSA
7_34_1	10	"	"	"	QVQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSGGSIS	SYYW S	WIRQPPG RGLEWIG	YFFYSGYTN YNPSLKS	RVTMSVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCAC	ITGTTKG GMDV	WGQGAT VTVSSA
7_251_3	14	"	"	"	QVQLQESGPGLVKPS ETLSLTCTVSGGSIS	SYYW S	WIRQPPG KGLEWIG	YFFYSGYTN YNPSLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCAC	ITGTTKG GMDV	WGQGTT VTVSSA

* La designación (#) indica un espacio en la línea germinal y se usa para mostrar una alineamiento adecuado con las secuencias de anticuerpo ilustradas en la tabla.

** Las secuencias de línea germinal indicadas en la tabla son para propósitos de alineamiento, y debe notarse que cada región de anticuerpo individual existe en su porpia ubicación en las regiones variables de segmentos de ADN de línea germinal de inmunoglobulina *in vivo*.

TABLA 12. ANÁLISIS DE CADENA LIGERA

Nombre de la Cadena	SEQ ID NO.	V	J	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Línea Germinal	76	V1-19	JL 2	QSVLTQPPSVSA APGQKVTISC	SGSSSNI GNNYVS	WYQQLPGT APKLLIY	DNNKRPS	GIPDRFSGSKSGTSAT LGITGLQTGDEADYYC	GTWDSSL SA##V	FGGGTK LTVLG
7_159_1	8	"	"	QSVLTQPPSVSA APGQKVTISC	SGSSSNI ENNHVS	WYQQLPGT APKLLIY	DNNKRPS	GIPDRFSGSKSGTSAT LGITGLQTGDEADYYC	ETWDTSL SAGRV	FGGGTK LTVLG
Línea Germinal	78	L5	JK 3	DIQMTQSPSSVS ASVGDRVTITC	RASQGIS SWLA	WYQQKPGK APKLLIY	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYC	QQANSFP FT	FGPGTK VDIKR
7_158_1	4	"	"	DIQMTQSPSSVS ASVGDSVTITC	RASQGIS SYLA	WYQQKPGK APKLLIY	AASSLQS	GVPSRFSGNGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYC	QQANNFP FT	FGPGTK VDIKR
7_234_1	20	"	"	DIQMTQSPSSVS ASVGDRVTITC	RASRGIS SWLA	WYQQRPGK APKLLIY	TASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYC	QQANSFP FT	FGPGTK VDIKR
Línea Germinal	80	V1-13	JL 2.	QSVLTQPPSVSG APGQRVTISC	TGSSSNI GAGYDVH	WYQQLPGT APKLLIY	GNSNRPS	GVPDRFSGSKSGTSAS LAITGLQAEDEADYYC	QSYDSSL SGSV	FGGGTK LTVLG
7_34_1	12	"	"	QSVLTQAPSVSG APGQRVTISC	TGRSSNI GAGYDVH	WYQQFPGT APKLLIY	GNSNRPS	GVPDRFSGSKSGTSAS LAITGLQAEDEADYYC	QSYDSSL SGSV	FGGGTK LTVLG
7_251_3	16	"	"	QSVLTQPPSVSG APGQRVTISC	TGSSSNI GAGYDVH	WYQQLPGT APKLLIY	GNNNRPS	GVPDRFSGSKSGTSAS LAITGLQADDEADYYC	QSFDSSL SGSV	FGGGTK LTVLG

* La designación (#) indica un espacio en la línea germinal y se usa para mostrar una alineamiento adecuado con las secuencias de anticuerpo ilustradas en la tabla.

** Las secuencias de línea germinal indicadas en la tabla son para propósitos de alineamiento, y debe notarse que cada región de anticuerpo individual existe en su propia ubicación en las regiones variables de segmentos de ADN de línea germinal de inmunoglobulina.

EJEMPLO 12

INHIBICIÓN DE LA FOSFORILACIÓN INDUCIDA POR IGF-I E IGF-II DE hIGF-IR EXPRESADO ECTÓPICAMENTE EN CÉLULAS NIH3T3

[0206] Los ligandos IGF ejercen sus funciones de proliferación y anti-apoptosis activando la actividad de tirosina cinasa de receptor en el receptor IGF-IR. Con el fin de evaluar los anticuerpos anti-IGF-I/II con respecto a su capacidad de inhibir la fosforilación inducida por IGF de IGF-IR, se utilizaron células NIH3T3, que expresan ectópicamente hIGF-IR, en el siguiente análisis.

[0207] Células NIH3T3 que expresan ectópicamente el IGF-IR humano se sembraron en una placa de 96 pocillos con una densidad de 10.000 células por pocillo y se incubaron de un día para otro en medio de inanición (1% FBS separado en carbón vegetal). Al día siguiente, se descartó el medio de cultivo, los pocillos de lavaron cuidadosamente dos veces con PBS, y se agregaron 100µL de medio libre de suero (0% FBS) para hacer morir las células por inanición. Luego de 1-2 horas, se agregaron a las células en triplicado 100µl de medio libre de suero con 0.05% BSA que contenía IGF-I (10nM) o IGF-II (10nM), que se había pre-incubado durante 60 minutos a 37°C con diferentes concentraciones de anticuerpo. Se permitió que ocurriera la estimulación durante 10 minutos a 37°C; luego de la estimulación, se retiró el medio y se agregaron 100µL 3.7% fromaldehído en PBS/3% BSA a cada pocillo y se incubó a temperatura de la sala durante 20 minutos. Las células se lavaron 2X con PBS y se agregaron 100µL de solución amortiguadora de permeabilización (0.1% Triton-X en 3%BSA/PBS) a cada pocillo. Se dejó incubar a temperatura de la sala durante 10 minutos, se descartó y se agregaron 100µl de 0.6% peróxido de hidrógeno en PBS/3% BSA para inactivar cualquier actividad peroxidasa endógena. Después de la incubación durante 20 minutos a temperatura de la sala, las células se lavaron 3X con PBS/0.1% Tween-20 y se bloquearon agregando 100µL 10% FBS en PBS/0.1% Tween-20 a temperatura de la sala durante 1 hora. A continuación se retiró la solución amortiguadora de

bloqueo y 50µL anticuerpo anti-phospho IGFIR con 1ug/ml (Cat. # 44-804, BioSource) se agregaron a cada pocillo en 10% FBS/PBS-T. Luego de 2 horas de incubación a temperatura ambiente las células se lavaron 3X con PBST remojando durante 5 minutos entre cada lavado. Después de los lavados, se agregaron a cada uno de los pocillos 50ul de un anticuerpo secundario IgGFc-HRP a Goat anti-conejo en cabra, diluido 1:250 en solución amortiguadora de bloqueo. Luego de 1 hora de incubación a temperatura de la sala las células se lavaron 3X durante 5 minutos con PBST, como antes, y se secaron ("***tapped dry***"). A continuación se agregaron 50ul de reactivo ECL (DuoLux) y se leyeron las RLUs inmediatamente.

[0208] Se cribaron treinta y dos (32) líneas de anticuerpo, y se realizaron dos análisis independientes para cada antígeno. Los resultados para los diez anticuerpos principales se resumen en la siguiente Tabla 13.

TABLA 13.

RESUMEN DE LA INHIBICIÓN DE LA FOSFORILACIÓN IGF-IR DEPENDIENTE DE IGF EN CÉLULAS NIH3T3

	Resultados IGF-I pTYR (n=2)				**Resultados IGF-II pTYR (n=2)**			
	% Activación máx. Activation		**EC_{50} (nM)***		**% Activación máx.**		**EC_{50} (nM)***	
mAb ID	**Media**	**SD**	**Media**	**SD**	**Media**	**SD**	**Media**	**SD**
7.159.2	16.5%	6.6%	7.4	0.8	28.6%	5.4%	3.1	0.2
7.34.1	14.2%	1.8%	9.4	0.8	21.5%	3.9%	2.5	0.1
7.146.3	19.5%	3.9%	19.0	5.7	23.6%	2.1%	3.6	0.2
7.251.3	16.9%	5.4%	14.5	0.7	15.9%	1.5%	3.0	0.9
7.234.2	21.1%	3.0%	24.3	1.0	21.1%	0.1%	7.7	0.1
7.160.2	33.6%	6.4%	22.9	0.1	21.5%	0.6%	4.7	0.2
7.158.2	22.7%	0.9%	28.3	0.5	33.7%	2.4%	11.3	3.2
7.56.3	31.3%	2.2%	25.1	4.3	21.2%	0.2%	6.3	0.5
7.118.1	24.1%	5.2%	40.8	2.6	21.8%	3.2%	13.9	5.3
7.41.3	33.1%	6.1%	47.1	7.0	29.5%	4.4%	3.5	4.0

* Estos análisis se realizaron bajo condiciones limitantes de antígeno, dada la mAb KD para IGF-I e IGF-II.

EJEMPLO 13

INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN, INDUCIDA POR IGF-I E IGF-II, DE CÉLULAS NIH3T3 TRANSFECTADAS CON HIGF-IR

[0209] Como se discute anteriormente, uno de los criterios para neutralizar anticuerpos IGF-I/II es la capacidad de inhibir la proliferación inducida por IGF. Con el fin de evaluar los anticuerpos con respecto a su capacidad de inhibir la proliferación inducida por IGF, se utilizaron en el siguiente análisis células NIH3T3 que expresan hIGF-IR ectópicamente.

[0210] Células NIH3T3 que expresan hIGF-IR ectópicamente se sembraron en una placa de 96 pocillos con una densidad de 5.000 células por pocillo y se cultivaron de un día para otro en medio de inanición (1% FBS separado en carbón vegetal). El día siguiente, se descartó el medio de cultivo, los pocillos se lavaron cuidadosamente dos veces en medio sin suero, y se agregaron 100µL de medio libre de suero para hacer morir por inanición las células. 100µL de medio de inanición que contenía 15ng/ml IGFI o 50ng/ml IGFII pre-incubado durante 30 minutos a 37°C con varias concentraciones de anticuerpo a las células en duplicado o triplicado. Luego de una incubación durante 20 horas las células se someten a pulsación con BrdU por 2 horas y se cuantifica el grado de incorporación (proliferación) usando un kit ELISA de Proliferación Celular de Roche (Roche, Cat. # 1 647 229).

[0211] Se identificaron sistemáticamente un total de 32 líneas de anticuerpo, y se realizaron dos o tres análisis independientes para cada antígeno. Los resultados de los 10 principales anticuerpos se resumen en la siguiente Tabla 14.

TABLA 14

RESUMEN DE INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DEPENDIENTE DE IGF DE CÉLULAS NIH3T3/MGF-IR

	Análisis de Proliferación IGF-I				Análisis de Proliferación IGF-II			
	% Inhibición		EC_{50} (nM)*		% Inhibición		EC_{50} (nM)*	
mAb ID	**Media (n=3)**	**SD**	**Media (n=3)**	**SD**	**Media (n=2)**	**SD**	**Media (n=2)**	**SD**
7.159.2	77.0%	9.6%	24.1	5.9	99.3%	0.6%	7.6	2.5
7.34.1	72.6%	5.6%	23.4	8.1	73.6%	11.8%	16.3	0.4
7.146.3	65.3%	5.5%	37.2	4.5	82.0%	6.9%	15.9	3.4
7.251.3	72.4%	15.3%	38.9	4.3	79.2%	7.8%	22.0	3.7
7.234.2	67.3%	6.9%	40.6	4.6	62.1%	17.2%	24.3	2.4
7.160.2	62.8%	5.7%	47.6	10.7	45.9%	0.8%	24.7	2.8
7.158.2	57.4%	19.5%	42.8	1.7	54.6%	6.6%	36.0	4.2
7.56.3	50.2%	7.8%	65.7	31.9	48.0%	10.9%	38.3	7.5
7.118.1	59.4%	14.5%	1626.6	2714.5	68.3%	0.8%	49.9	3.8
7.41.3	29.5%	14.7%	76.3	35.9	51.9%	13.7%	61.9	23.7

* Estos análisis pueden haberse realizado bajo condiciones limitantes de antígeno, dada la mAb KD para IGF-I e IGF-II.

EJEMPLO 14

INHIBICIÓN DE LA FOSFORILACIÓN, INDUCIDA POR IGF-I E IGF-II DE hIGF-IR EXPRESADO EN CÉLULAS TUMORALES PANCREÁTICAS HUMANAS BxPC3

[0212] IGF-I/II ejercen sus funciones de proliferación y anti-apoptosis activando la actividad tirosina cinasa de receptor en el receptor IGF-IR. Con el fin de evaluar los anticuerpos con respecto a su capacidad de inhibir la fosforilación, inducida por IGF, de IGF-IR, se utilizaron en el siguiente análisis células tumorales pancreáticas humanas BxPC3, que expresan hIGF-IR endógeno.

[0213] Células BxPC3 se sembraron en una placa de 96 pocillos con una densidad de 55.000 células por pocillo y se incubaron de un día para otro en medio de cultivo regular. El día siguiente, el medio de cultivo se descartó, los pocillos se lavaron cuidadosamente en medio sin suero, y se

agregaron 100µL de medio libre de suero para hacer morir por inanición las células. Luego de 24 horas, se descartó el medio, y las células se lavaron cuidadosamente una vez en medio sin suero. Medio libre de suero con 0.05% BSA que contenía IGF-I (20ng/ml) o IGF-II (75ng/ml) se pre-incubó durante 30 minutos a 37°C con varias concentraciones de anticuerpo, y a continuación se agregaron 100µL a las células en triplicado. Las placas se incubaron durante 15 minutos a 37°C y, posteriormente, se enjuagaron con PBS (solución salina amortiguada con fosfato) fría. Se agregaron 100µL de solución amortiguadora de lisis a los pocillos y las placas se incubaron durante 30 minutos a 4°C. Los lisados se centrifugaron a 2.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, y se recogió el sobrenadante. Se cuantificó la fosforilación de IGF-IR usando el kit Duoset human phosphor-IGF-IR ELISA (R&D Systems, Cat. No. DYC1770).

[0214] Se detectaron/identificaron selectivamente diez líneas de anticuerpo, y se realizaron dos análisis independientes por cada antígeno. Los resultados se resumen en la siguiente Tabla 15.

TABLA 15

RESUMEN DE LA INHIBICIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE IGF-IR DEPENDIENTE DE IGF

	Resultados IGF-I pTYR (n=2)				Resultados IGF-II pTYR (n=2)			
	n=1		n=2		n=1		n=2	
mAb ID	Inhibición % máx. (333.3nM)	EC_{50} (nM)	Inhibición % máx. (333.3nM)	EC_{50} (nM)	Inhibición % máx. (333.3nM)	EC_{50} (nM)	* Inhibición % máx. (133.3nM)	EC_{50} (nM)
7.159.2	100.0	3.3	100.0	1.6	100.0	1.6	91.2	1.7
7.34.1	100.0	5.9	98.5	3.8	100.0	2.0	89.7	1.9
7.146.3	96.4	16.1	94.2	10.7	100.0	2.0	87.9	2.0
7.251.3	95.7	7.5	95.2	5.3	100.0	N.D.	91.3	2.6
7.234.2	97.3	5.1	91.5	2.9	98.5	1.9	77.3	2.3
7.160.2	93.4	5.3	89.2	3.1	88.6	1.7	73.2	2.5
7.158.2	92.9	4.5	89.4	3.6	92.4	N.D.	74.0	4.2
7.56.3	84.9	N.D.	88.7	6.5	91.4	10.1	66.2	5.1
7.118.1	90.5	13.1	90.6	11.8	95.7	17.9	78.0	13.1
7.41.3	88.6	6.5	86.5	6.5	88.6	4.5	70.6	3.1

*333nM para los últimos 3 anticuerpos

N.D.: No Determinada

EJEMPLO 15

INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN INDUCIDA POR IGF-I E IGF-II DE CÉLULAS TUMORALES PANCREÁTICAS HUMANAS BxPC3

[0215] Como se discute anteriormente, uno de los criterios para neutralizar anticuerpos IGF es la capacidad de inhibir la proliferación inducida por IGF. Con el fin de evaluar los anticuerpos con respecto a su capacidad de inhibir la proliferación inducida por IGF, se utilizaron en el siguiente análisis células tumorales pancreáticas humanas BxPC3, que expresan hIGF-IR endógeno.

[0216] Células BxPC3 se sembraron en una placa de 96 pocillos con una densidad de 2.000 células por pocillo y se cultivaron de un día para otro en medio de cultivo regular. El día siguiente, se descartó el medio de cultivo, los pocillos se lavaron cuidadosamente dos veces en medio sin suero, y se agregaron 100µL de medio libre de suero con 10µg/ml de transferrina y 0.1% BSA (medio de análisis) para hacer morir por inanición las células. Después de 24 horas, se descartó el medio, las células se lavaron cuidadosamente una vez en medio sin suero, y 100µL de medio de análisis que contenía 20ng/ml IGF preincubada durante 30 minutos a 37°C con varias concentraciones de anticuerpo se agregaron a las células en duplicado o triplicado. Las placas se incubaron durante 3 días, y se cuantificó la proliferación usando el reactivo CellTiter-Glo (Promega).

[0217] Se detectaron/identificaron selectivamente/cribaron diez líneas de anticuerpo, y se realizaron dos o tres análisis independientes por cada antígeno. Los resultados se resumen en la siguiente Tabla 16. Basándose en los siguientes datos funcionales y en los datos del Ejemplo 14, se seleccionaron los cuatro mejores anticuerpos. Los datos de proliferación inducida por IGF-I se excluyeron de los criterios de selección debido a la elevada variablidad de análisis observada.

TABLA 16. RESUMEN DE LA INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DEPENDIENTE DE IGF DE CÉLULAS TUMORALES PANCREÁTICAS HUMANAS BxPC3

	Resultados de la Proliferación IGF-II (n=2)			
	n=1		**n=2**	
MAb ID	**Inhibición % Máx. (333.3nM)**	**EC_{50} (nM)**	*** Inhibición % Máx. (133.3nM)**	**EC_{50} (nM)**
7.159.2	120.0	0.8	118.3	0.9
7.34.1	117.0	0.5	109.0	6.7
7.146.3	128.7	3.0	119.5	7.3
7.251.3	128.5	0.5	105.3	4.4
7.234.2	111.7	N.D.	200.7	2.6
7.160.2	79.7	1.1	155.7	N.D.
7.158.2	86.3	0.0013	148.3	N.D.
7.56.3	87.0	N.D.	112.3	102.0
7.118.1	114.0	34.0	137.0	54.7
7.41.3	102.0	N.D.	73.0	N.D.

*333nM para los 3 últimos anticuerpos

N.D.: No Determinada

EJEMPLO 16

DETERMINACIÓN DE LA REACTIVIDAD CRUZADA CON IGF-I, IGF-II E INSULINA

[0218] Un objetivo era desarrollar anticuerpos que fueran específicos de IGF-I e IGF-II, pero que no tuvieran reactividad cruzada con insulina. Con el fin de realizar experimentos posteriores en animales, los anticuerpos debían reaccionar también cruzadamente con IGF-I/II murino pero no insulina murina. Por consiguiente, se llevaron a cabo análisis ELISA para determinar si anticuerpos seleccionados eran capaces de reaccionar cruzadamente con IGFs murinos o insulina.

[0219] Como se muestra en la Tabla 17, cinco de los diez principales anticuerpos se examinaron con respecto a reactividad cruzada con insulina de ratón o rata mediante ELISA. Los ELISAs mostraron que estos anticuerpos no tenían reactividad cruzada con insulina de ratón o rata, comparados con el anticuerpo PK.16.3.1de control negativo y en contraste

con el anticuerpo insulina anti-rata de control positivo.

TABLA 17. REACTIVIDAD CRUZADA CON INSULINA DE RATÓN

	OD 450 CON Ag diferente		
Anticuerpos	**Insulina de ratón**	**Insulina de Rata**	**No Ag**
7.159.2	0.52	0.52	0.56
7.160.2	0.60	0.57	0.62
7.34.1	0.48	0.47	0.55
7.251.3	0.55	0.53	0.56
7.234.2	0.51	0.49	0.66
Suero	1.28	1.23	1.34
Insulina anti-Rata	2.52	3.06	0.10
PK16.3.1	0.58	0.58	0.62

EJEMPLO 17

INHIBICIÓN DE FOSFORILACIÓN, INDUCIDA POR IGF-I E IGF-II DE RATÓN, DE IGF-IR HUMANO EXPRESADO ECTÓPICAMENTE EN CÉLULAS NIH3T3

[0220] Los anticuerpos monoclonales con reactividad cruzada con IGF-I e IGF-II se ratón se analizaron adicionalmente con el fin de determinar la media en que inhiben la fosforilación, inducida por IGF, de IGF-IR. Este análisis se realizó como se describe previamente, utilizando células NIH3T3 que expresan ectópicamente el receptor hIGF-IR. Los resultados de este análisis se resumen en la Tabla 18.

[0221] Células NIH3T3 que expresan ectópicamente el IGF-IR humano se sembraron en una placa de 96 pocillos con una densidad de 10.000 células por pocillo y se incubaron de un día para otro en medio de inanición (1% de FBS separado en carbón vegetal). El siguiente día, se descartó el medio de cultivo, los pocillos se lavaron cuidadosamente dos veces con PBS, y se agregaron 100µL de medio libre de suero (0% FBS) para hacer morir de inanición las células. Luego de 1-2 horas, se agregaron a las células en triplicado 100µl de medio libre de suero con 0.05% BSA que contenía IGF-I (10nM) o IGF-II de ratón (l0nM) (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN Cat. No. 791-MG y 792-MG respectivamente) que se

había pre-incubado durante 60 minutos a 37°C con varias concentraciones de anticuerpo. Se dejó que ocurriera estimulación durante 10 minutos a 37°C; luego de la estimulación, se retiró el medio y se agregaron 100µL 3.7% formaldehído en PBS/3% BSA a cada pocillo y se incubó a temperatura de la sala durante 20 minutos. A continuación las células se lavaron 2X con PBS y se agregaron a cada pocillo 100µL de solución amortiguadora de permeabilización (0.1% Triton-X en 3% BSA/PBS). Esto de dejó incubar a temperatura de la sala durante 10 minutos, se descartó y se agregaron 100µl de 0.6% peróxido de hidrógeno en PBS/3% BSA para inactivar cualquier actividad peroxidasa endógena. Luego de una incubación de 20 minutos a temperatura de la sala, las células se lavaron 3X con PBS/0.1% Tween-20 y se bloquearon agregando 100µL 10% FBS en PBS/0.1% Tween-20 a temperatura de la sala durante 1 hora. Seguidamente se retiró la solución amortiguadora de bloqueo y se agregaron 50µL de anticuerpo anti-phospho IGF-IR a 1ug/ml (Cat. # 44-804, BioSource) a cada pocillo en 10%FBS/PBS-T. Luego de 2 horas de incubación a temperatura de la sala las células se lavaron 3X con impregnado con PBST durante 5 minutos entre cada lavado. Luego de los lavados se agregaron a cada uno de los pocillos 50ul/pocillo de un anticuerpo secundario IgGFc-HRP anti-conejo en cabra diluido 1:250 en solución amortiguadora de bloqueo. Luego de 1 hora de incubación a temperatura de la sala las células se lavaron 3X durante 5 minutos con PBST, como antes, y se secaron. En seguida se agregaron 50ul de reactivo ECL (DuoLux) y se leyeron las RLUs inmediatamente.

TABLA 18. INHIBICIÓN DE LA FOSFORILACIÓN, INDUCIDA POR IGF DE RATÓN, DE hIGF-IR

	EC_{50} de IGF-I de Ratón (nM)		**EC_{50} de IGF-II de Ratón (nM)**	
mAb ID	**n=1**	**n=2**	**n=1**	**n=2**
7.159.2	2.8	5.7	3.1	5.0
7.34.1	6.0	10.2	4.0	9.7

	EC_{50} de IGF-I de Ratón (nM)		EC_{50} de IGF-II de Ratón (nM)	
mAb ID	**n=1**	**n=2**	**n=1**	**n=2**
7.251.3	6.7	10.6	5.4	8.7
7.234.2	46.0		36.1	
7.160.2	49.5		225.2	

EJEMPLO 18

INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE CÉLULAS N1H3T3 QUE EXPRESAN IGF-II E IGF-1R *IN VIVO* EN RATONES ATÍMICOS

[0222] Con el fin de evaluar los anticuerpos con respecto a su capacidad de inhibir la proliferación inducida por IGF-II *in vivo*, se llevaron a cabo los siguientes experimentos.

[0223] Ratones atímicos hembra de 6-8 semanas de edad (suministrados por Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA) se implantaron subcutáneamente con $5x10^6$ células clon 32 (células NIH3T3 que sobre-expresan ectópicamente IGF-II humano e IGF-IR humano). Las células se suspendieron en PBS en un volumen de inóculo total de 330 µl. Se dejaron crecer los tumores a 100-200 mm^3 antes del tratamiento con los anticuerpos monoclonales 7.159.2, 7.34.1 y 7.251.3. Anticuerpos o anticuerpo de control de isotipo IgG2 suspendidos en PBS se administraron intraperitonealmente a grupos aleatorizados de 9 o 12 ratones semanalmente durante 4 semanas a 5 o 50 mg/kg a partir del día 22. PBS es administró como control vehículo a un grupo adicional de 11 ratones semanalmente durante 4 semanas a partir del día 22. Se midieron el tamaño del tumor y el peso corporal 2-3 veces por semana. Los resultados se resumen en Figuras 1 y 2.

[0224] Se observó una inhibición significativa del crecimiento del tumor (véase Figura 1) sin que ocurriera pérdida de peso significativa en ningún grupo (véase Figura 2). Los anticuerpos 7.159.2, 7.34.1 y 7.251.3 inhibieron significativamente el crecimiento de los tumores clon 32 con 5 y 50 mg/kg/semana (véase Figura 1).

EJEMPLO 19

INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE CÉLULAS NIH3T3 QUE EXPRESAN IGF-I E IGF-1R *IN VIVO* EN RATONES ATÍMICOS

[0225] En el ejemplo previo, se demostró que los anticuerpos inhibieron la proliferación inducida por IGF-II *in vivo.* Con el fin de evaluar los anticuerpos con respecto a su capacidad de inhibir la proliferación inducida por IGF-I *in vivo*, se realizaron los siguientes experimentos.

[0226] Ratones hembra atímicos (cepa Alderley Park derivada de la cepa de ratones nu/nu Swiss, suministrada por AstraZeneca) se implantaron con $5x10^6$ células P12 viables [células NIH3T3 que sobre-expresan ectópicamente IGF-I humano e IGF-1R humano (Pietrzkowski et al, Cell Growth & Differentiation, 3, 199-205, 1992)] subcutáneamente en el flanco izquierdo. Las células se suspendieron en PBS en un volumen de inóculo total de 0.1 ml. Dos grupos de animales (cada uno n=10) se dosificaron dos veces semanalmente a partir del día del implante de las células NIH3T3 con mAb 7.159.2 a 1.0 mg por ratón o con un volumen equivalente de vehículo PBS (0.3 ml) para la misma pauta. Todas las dosis se administraron intraperitonealmente por vía (i.p.). Se cuantifican los pesos de los animales diariamente y, una vez establecidos, se toman medidas de los tumores dos veces semanalmente usando calibres. Se calculó el volumen de todos los tumores medibles a partir de las mediciones de los calibres asumiendo una forma ovoide. Los resultados se resumen en Figura 3.

[0227] Como se muestra en Figura 3, se observó una significativa inhibición del crecimiento del tumor con mAb 7.159.2 luego de la administración i.p., dos veces por semana, de 1.0mg anticuerpo/ratón. No se observó pérdida significativa de peso en ninguno de los grupos de animales.

EJEMPLO 20

INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE CÉLULAS TUMORALES EN PACIENTES HUMANOS

[0228] Un grupo de pacientes humanos con cáncer, diagnosticados con cáncer pancreático, se aleatoriza en grupos de tratamiento. Cada grupo de pacientes se trata con inyecciones intravenosas semanales de mAb 7.159.2, 7.34.1 o 7.251.3 descritos en esta solicitud. Cada paciente se dosifica con una cantidad efectiva del anticuerpo que varía desde 50 mg/kg a 2.250 mg/kg durante 4-8 semanas. A un grupo de control se le administra únicamente el régimen quimioterapéutico estándar.

[0229] En horas periódicas durante y después del régimen de tratamiento, se evalúa la masa tumoral mediante escaneador de resonancia magnética (MRI). Se descubrió que los pacientes que recibieron tratamiento semanal de anticuerpo con mAb 7.159.2, 7.34.1 o 7.251.3 muestran reducciones significativas en el tamaño de los tumores, comparados con pacientes que no recibieron tratamiento con anticuerpo. En algunos pacientes tratados, los tumores ya no se detectan. En contraste, el tamaño del tumor aumenta o permanece sustancialmente el mismo en el grupo de control.

EJEMPLO 21

INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE CÉLULAS TUMORALES EN UN PACIENTE HUMANO

[0230] Se diagnosticó un paciente humano con un tumor maligno. El paciente es tratado con inyecciones intravenosas semanales de mAb 7.159.2 durante 8 semanas. En horas periódicas durante y después del régimen de tratamiento, se evalúa la masa tumoral mediante escaneador de resonancia magnética (MRI). Se detectaron reducciones significativas en el tamaño del

tumor.

EJEMPLO 22
TRATAMIENTO DE ACROMEGALIA EN UN PACIENTE HUMANO

[0231] Un adulto masculino se diagnosticó con acromegalia. El paciente es tratado con inyecciones intravenosas bi-semanales de mAb 7.34.1 durante un período de 2 años. Como resultado, el paciente experimenta una significativa reducción en los síntomas de acromegalia.

EJEMPLO 23
TRATAMIENTO DE PSORIASIS EN UN PACIENTE HUMANO

[0232] Un adulto femenino se diagnosticó con psoriasis. El paciente es tratado con inyecciones intravenosas bi-semanales de mAb 7.251.3 durante un período de 3 semanas. Como resultado, el paciente experimenta una significativa reducción en los síntomas de psoriasis.

EJEMPLO 24
TRATAMIENTO DE OSTEOPOROSIS EN UN PACIENTE HUMANO

[0233] Un adulto femenino se diagnosticó con osteoporosis. El paciente es tratado con inyecciones intravenosas bi-semanales de mAb 7.159.2 durante un período de 1 año. Como resultado, hay una significativa reducción en la pérdida de densidad ósea.

EJEMPLO 25
TRATAMIENTO DE ATEROSCLEROSIS EN UN PACIENTE HUMANO

[0234] Un adulto masculino se diagnosticó con aterosclerosis. El paciente es tratado con inyecciones intravenosas bi-semanales de mAb

7.34.1 durante un período de 1 año. Como resultado, el paciente experimenta una reducción en los síntomas de aterosclerosis, tal como angina pectoris.

EJEMPLO 26
TRATAMIENTO DE RESTENOSIS EN UN PACIENTE HUMANO

[0235] Un adulto masculino recibe angioplastia para aliviar una arteria bloqueada. Luego del procedimiento de angioplastia, el paciente se trata con inyecciones intravenosas bi-semanales de mAb 7.251.3 durante un período de 1 año. Como resultado, el paciente no experimenta restenosis de la arteria tratada.

EJEMPLO 27
TRATAMIENTO DE DIABETES EN UN PACIENTE HUMANO

[0236] Un adulto femenino se diagnosticó con diabetes. El paciente es tratado con inyecciones intravenosas bi-semanales de mAb 7.159.2 durante un período de 1 año. Como resultado, se reducen los síntomas de diabetes.

SECUENCIAS

[0237] Los hibridomas subclonados se secuenciaron para determinar su estructura primaria tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos para los dos genes de cadena pesada variable y cadena ligera variable. Las secuencias de nucleótidos y polipéptidos de las regiones variables de los anticuerpos monoclonales contra IGF-I e IGF-II, como se enumeran en la Tabla 1, se proveen en el Listado de Secuencias.

INCORPORACIÓN POR REFERENCIA

[0238] Todas las referencias citadas en esta solicitud, incluidas patentes, solicitudes de patente, artículos, libros de texto, y similares, y las referencias citadas en esta solicitud, en la medida en que aún no lo estén, se incorporan en esta solicitud por referencia en su integridad.

EQUIVALENTES

[0239] La anterior especificación escrita se considera suficiente para permitirle a un experto en el arte poner en práctica la invención. La descripción que antecede y los Ejemplos detallan ciertas incorporaciones preferidas de la invención y describe el mejor modo contemplado por los inventores. Se observará, sin embargo, que sin importar cuán detallado pueda aparecer lo anterior en el texto, la invención se puede ponerse en práctica de muchas maneras y la invención debe interpretarse de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas y cualesquiera equivalentes de la misma.

LO QUE SE REIVINDICA ES:

1. Una proteína de unión específica, aislada, completamente humana, que preferencialmente se une al factor II de crecimiento insulinoide (IGF-II) con reactividad cruzada al factor I de crecimiento insulinoide (IGF-I) y neutraliza la actividad de IGF-I e IGF-II.

2. La proteína de unión específica de la reivindicación 1, en donde la citada proteína de unión se une a IGF-II con una afinidad por lo menos 2.5 veces mayor que a IGF-I.

3. La proteína de unión específica de la reivindicación 1, en donde la citada proteína de unión tiene una EC_{50} de no más de 15 nM para inhibir La fosforilación del receptor IGF-I dependiente de IGF-I en células NIH3T3 que expresan IGF-1R ectópicamente.

4. La proteína de unión específica de la reivindicación 1, en donde la citada proteína de unión tiene una EC_{50} de no más de 5 nM para inhibir La fosforilación del receptor IGF-I dependiente de IGF-II en células NIH3T3 que expresan IGF-1R ectópicamente.

5. La proteína de unión específica de la reivindicación 1, en donde la citada proteína de unión inhibe más del 70% de la proliferación, dependiente de IGF-II, de células NIH3T3 que expresan hIGF-IR recombinante con una EC_{50} de no más de 25 nM.

6. La proteína de unión específica de la reivindicación 1, en donde la citada proteína de unión inhibe más del 70% de la proliferación, dependiente de IGF-I, de células NIH3T3 que expresan hIGF-IR recombinante con una EC_{50} de no más de 40 nM.

7. La proteína de unión específica de la reivindicación 1, en

donde la citada proteína de unión compite por unión con el anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de cadena pesada variable seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NO.: 2, SEQ ID NO.: 6, SEQ ID NO.: 10, SEQ ID NO.: 14 y SEQ ID NO.: 18.

8. La proteína de unión específica de la reivindicación 7, en donde el citado anticuerpo monoclonal comprende una secuencia de cadena ligera variable seleccionada del grupo conformado por SEQ ID NO.: 4, SEQ ID NO.: 8, SEQ ID NO.: 12 y SEQ ID NO,: 16.

9. La proteína de unión específica de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la citada proteína de unión se une a IGF-I con una K_D de menos de 4 nM.

10. La proteína de unión específica de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la citada proteína de unión se une a IGF-I con una K_D de menos de 650 pM.

11. La proteína de unión específica de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la citada proteína de unión se une a IGF-II con una K_D de menos de 300 pM.

12. La proteína de unión específica de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la citada proteína de unión es un anticuerpo monoclonal completamente humano.

13. La proteína de unión específica de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la citada proteína de unión es un fragmento de unión de un anticuerpo monoclonal completamente humano.

14. La proteína de unión específica de la reivindicación 13, en donde el citado fragmento de unión se selecciona del grupo conformado por

Fab, Fab' o $F(ab')_2$ y Fv.

15. La proteína de unión específica de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la citada proteína de unión es anticuerpo monoclonal 7.251.3 (Número de Accesión ATCC PTA-7422).

16. La proteína de unión específica de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la citada proteína de unión es anticuerpo monoclonal 7.34.1 (Número de Accesión ATCC PTA-7423).

17. La proteína de unión específica de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la citada proteína de unión es anticuerpo monoclonal 7.159.2 (Número de Accesión ATCC PTA-7424).

18. La proteína de unión específica de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la citada proteína de unión comprende un polipéptido de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO.: 6.

19. La proteína de unión específica de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la citada proteína de unión comprende un polipéptido de cadena ligera que tiene la secuencia de SEQ ID NO.: 8.

20. La proteína de unión específica de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la citada proteína de unión comprende un polipéptido de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO.: 10.

21. La proteína de unión específica de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la citada proteína de unión comprende un polipéptido de cadena ligera que tiene la secuencia de SEQ ID NO.: 12.

22. La proteína de unión específica de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la citada proteína de unión comprende un

polipéptido de cadena pesada que tiene la secuencia de SEQ ID NO.: 14.

23. La proteína de unión específica de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la citada proteína de unión comprende un polipéptido de cadena ligera que tiene la secuencia de SEQ ID NO.: 16.

24. La proteína de unión específica de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en una mezcla con una sustancia portadora farmacéuticamente aceptable.

25. Una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de unión específica de la reivindicación 1.

26. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 25.

27. Una célula hospedera que comprende el vector de la reivindicación 26.

28. El anticuerpo monoclonal humano de la reivindicación 12, en donde el citado anticuerpo no se une específicamente a proteínas IGF-II o IGF-I cuando las citadas proteínas se unen a proteínas de unión al factor de crecimiento insulinoide.

29. Un método de determinar el nivel del factor II de crecimiento insulinoide (IGF-II) y factor I de crecimiento insulinoide (IGF-I) en una muestra de un paciente que comprende:

Provee una muestra del paciente;

Contactar la citada muestra con la proteína de unión de la reivindicación 1; y determinar el nivel de IGF-I e IGF-II en la citada muestra.

30. El método de acuerdo con la reivindicación 29 en donde la muestra del paciente es sangre.

31. Uso de la proteína de unión específica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un tumor maligno.

32. El uso de la reivindicación 31, donde la citada proteína de unión es un anticuerpo monoclonal completamente humano.

33. El uso de la reivindicación 31, en donde dicho tumor maligno se selecciona del grupo conformado por: melanoma, cáncer de pulmón amicrocítico, glioma, carcinoma hepatocelular (hígado), tumor tiroideo, cáncer gástrico (estómago), cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de la vejiga, cáncer de pulmón, glioblastoma, cáncer del endometrio, cáncer del riñón, cáncer de colon, cáncer de páncreas, y carcinoma epidermoide.

34. El uso de la reivindicación 32, en donde la proteína de unión es mAb 7.251.3 (Número de Accesión ATCC PTA-7422) o mAb 7.34.1 (Número de Accesión ATCC PTA-7423) o mAb 7.159.2 (Número de Accesión ATCC PTA-7424).

35. El uso de la reivindicación 31, en donde el citado medicamento es para uso en combinación con un segundo agente neoplásico seleccionado del grupo conformado por un anticuerpo, un agente quimioterapéutico, y un medicamento a radioactivo.

36. El uso de la reivindicación 31, en donde el citado medicamento es para uso en conjunción o luego de una cirugía convencional, un transplante de células madre de la médula ósea o un transplante de células madre de sangre periférica.

37. Uso de la proteína de unión específica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad dependiente del factor de crecimiento.

38. El uso de la reivindicación 37, en donde la citada proteína de unión es un anticuerpo monoclonal completamente humano.

39. El uso de la reivindicación 38, en donde el anticuerpo se selecciona del grupo conformado por mAb 7.251.3 (Número de Accesión ATCC PTA-7422), mAb 7.34.1 (Número de Accesión ATCC PTA-7423), y mAb 7.159.2 (Número de Accesión ATCC PTA-7424).

40. El uso de la reivindicación 37, en donde la enfermedad dependiente del factor de crecimiento se selecciona del grupo conformado por: osteoporosis, diabetes, y enfermedades cardiovasculares.

41. Un método de tratar un tumor maligno en un mamífero, que comprende:

seleccionar un mamífero necesitado de tratamiento para un tumor maligno; y

administrar al citado mamífero una dosis terapéuticamente efectiva de la proteína de unión específica de la reivindicación 1.

42. El método de la reivindicación 41, en donde el citado animal es humano.

43. El método de la reivindicación 41, donde la citada proteína de unión es un anticuerpo monoclonal completamente humano.

44. El método de la reivindicación 41, en donde el citado tumor maligno se selecciona del grupo conformado por: melanoma, cáncer de

pulmón amicrocítico, glioma, carcinoma hepatocelular (hígado), tumor tiroideo, cáncer gástrico (estómago), cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de la vejiga, cáncer de pulmón, glioblastoma, cáncer del endometrio, cáncer del riñón, cáncer de colon, cáncer de páncreas, y carcinoma epidermoide.

45. El método de la reivindicación 41, en donde la proteína de unión se selecciona del grupo conformado por mAb 7.251.3 (Número de Accesión ATCC PTA-7422), mAb 7.34.1 (Número de Accesión ATCC PTA-7423), y mAb 7.159.2 (Número de Accesión ATCC PTA-7424).

46. Un método de tratar una enfermedad dependiente del factor de crecimiento, que comprende:

seleccionar un mamífero necesitado de tratamiento para una enfermedad dependiente del factor de crecimiento; y

administrar al citado mamífero una dosis terapéuticamente efectiva de la proteína de unión específica de la reivindicación.

47. El método de la reivindicación 46, en donde el citado mamífero es humano.

48. El método de la reivindicación 46, en donde la citada proteína de unión es un anticuerpo monoclonal completamente humano.

49. El método de la reivindicación 46, en donde el anticuerpo se selecciona del grupo conformado por mAb 7.251.3 (Número de Accesión ATCC PTA-7422), mAb 7.34.1 (Número de Accesión ATCC PTA-7423), y mAb 7.159.2 (Número de Accesión ATCC PTA-7424).

50. El método de la reivindicación 46, en donde la enfermedad dependiente del factor de crecimiento se selecciona del grupo conformado por: osteoporosis, diabetes, y enfermedades cardiovasculares.

51. Un conjugado que comprende el anticuerpo de la reivindicación 12 o su fragmento de unión y un agente terapéutico.

52. El conjugado de la reivindicación 51, en donde el agente terapéutico es una toxina.

53. El conjugado de la reivindicación 51, en donde el agente terapéutico es un radioisótopo.

54. El conjugado de la reivindicación 51, en donde el agente terapéutico es una composición farmacéutica.

55. La proteína de unión específica de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la citada proteína de unión, o su fragmento de unión, comprende:

una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR.1) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Ser Tyr Tyr Tip Ser" (SEQ ID NO: 21);

una región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (CDR2) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Tyr Phe Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser" (SEQ ID NO: 22);

una región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (CDR3) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Ile Thr Gly Thr Thr Lys Gly Gly Met Asp Val" (SEQ ID NO: 23);

una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (CDR1) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His" (SEQ ID NO: 24);

una región determinante de complementariedad de cadena ligera 2 (CDR2) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser" (SEQ ID NO: 25); y

una región determinante de complementariedad de cadena ligera 3 (CDR3) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Gln Ser Phe Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val" (SEQ ID NO: 26).

56. La proteína de unión específica de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la citada proteína de unión, o su fragmento de unión, comprende:

una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Ser Tyr Tyr Trp Ser" (SEQ ID NO: 27);

una región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (CDR2) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Tyr Phe Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser" (SEQ ID NO: 28);

una región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (CDR3) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Ile Thr Gly Thr Thr Lys Gly Gly Met Asp Val" (SEQ ID NO: 29);

una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (CDR1) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Thr Gly Arg Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His" (SEQ ID NO: 30);

una región determinante de complementariedad de cadena ligera 2 (CDR2) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser" (SEQ ID NO: 31); y

una región determinante de complementariedad de cadena ligera 3 (CDR3) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val" (SEQ ID NO: 32).

57. La proteína de unión específica de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, b en donde la citada proteína de unión, o su fragmento de unión, comprende:

una región determinante de complementariedad de cadena pesada 1 (CDR1) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Ser Tyr

Asp Ile Asn" (SEQ ID NO: 33);

una región determinante de complementariedad de cadena pesada 2 (CDR2) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly" (SEQ ID NO: 34);

una región determinante de complementariedad de cadena pesada 3 (CDR3) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Asp Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val" (SEQ ID NO: 35);

una región determinante de complementariedad de cadena ligera 1 (CDR1) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Ser Gly Ser Ser Ser Asn lie Glu Asn Asn His Val Ser" (SEQ ID NO: 36);

una región determinante de complementariedad de cadena ligera 2 (CDR2) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser" (SEQ ID NO: 37); y

una región determinante de complementariedad de cadena ligera 3 (CDR3) que tiene la secuencia de aminoácidos de "Glu Thr Trp Asp Thr Ser Leu Ser Ala Gly Arg Val" (SEQ ID NO: 38).

Curva de Crecimiento de Tumor en Estudio de Eficacia con Clon 32 3T3 (todos los ratones vivos)

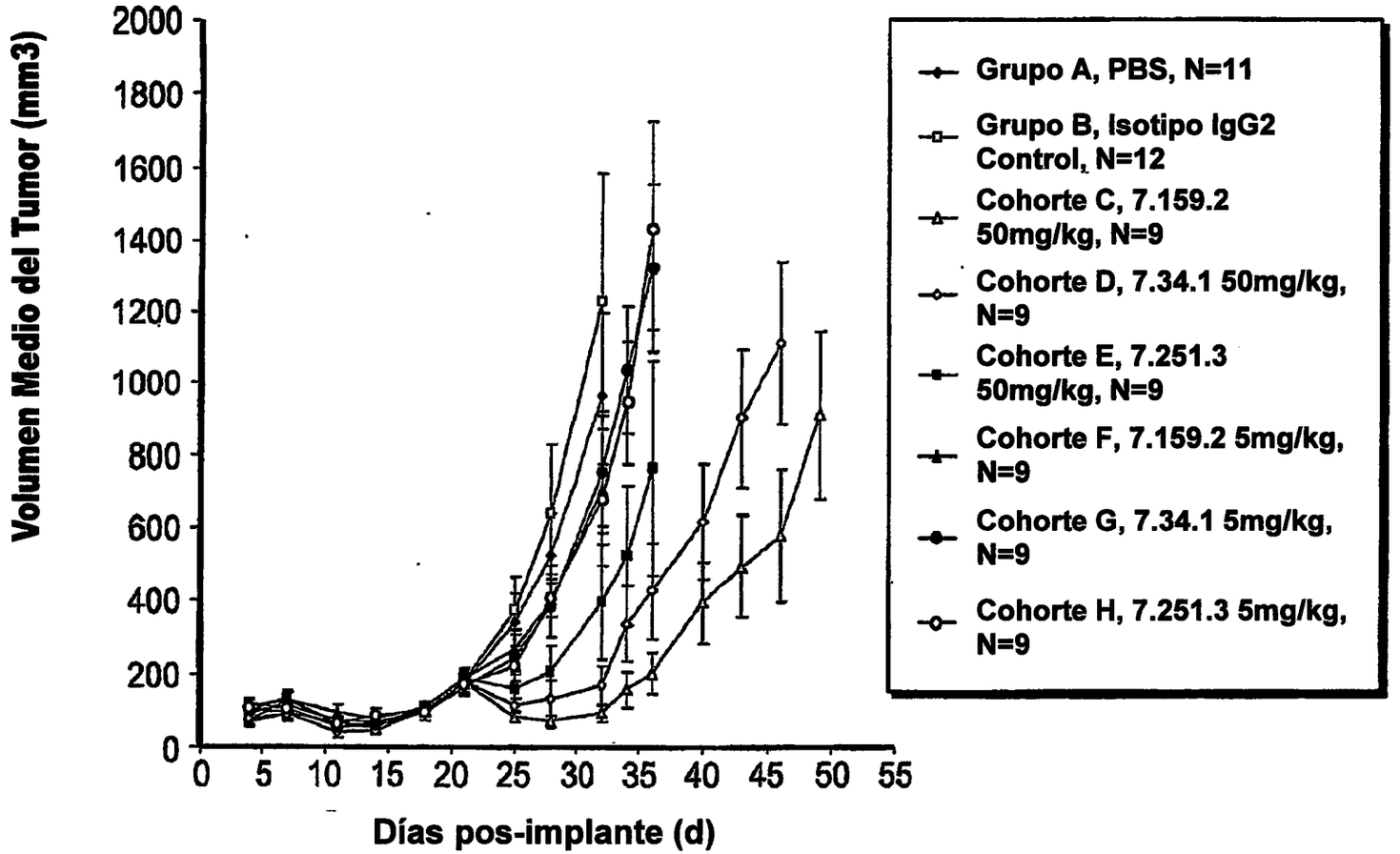


FIG. 1

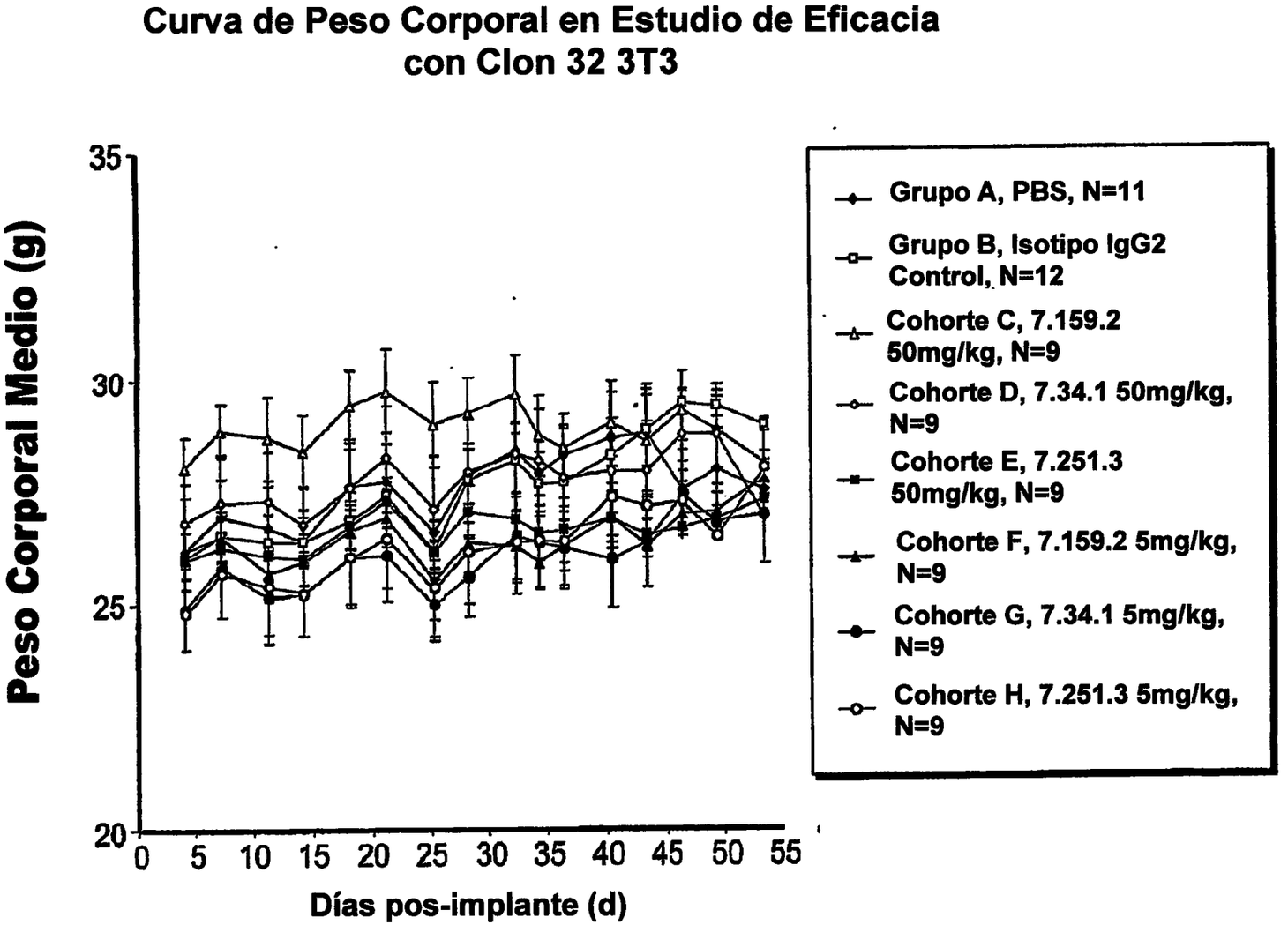

Curva de Peso Corporal en Estudio de Eficacia con Clon 32 3T3
Peso Corporal Medio (g)
35
30
25
20
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55
Días pos-implante (d)
Grupo A, PBS, N=11
Grupo B, Isotipo IgG2 Control, N=12
Cohorte C, 7.159.2 50mg/kg, N=9
Cohorte D, 7.34.1 50mg/kg, N=9
Cohorte E, 7.251.3 50mg/kg, N=9
Cohorte F, 7.159.2 5mg/kg, N=9
Cohorte G, 7.34.1 5mg/kg, N=9
Cohorte H, 7.251.3 5mg/kg, N=9

FIG. 2

Curva de Crecimiento de Tumor en Estudio de Eficacia 3T3 P12

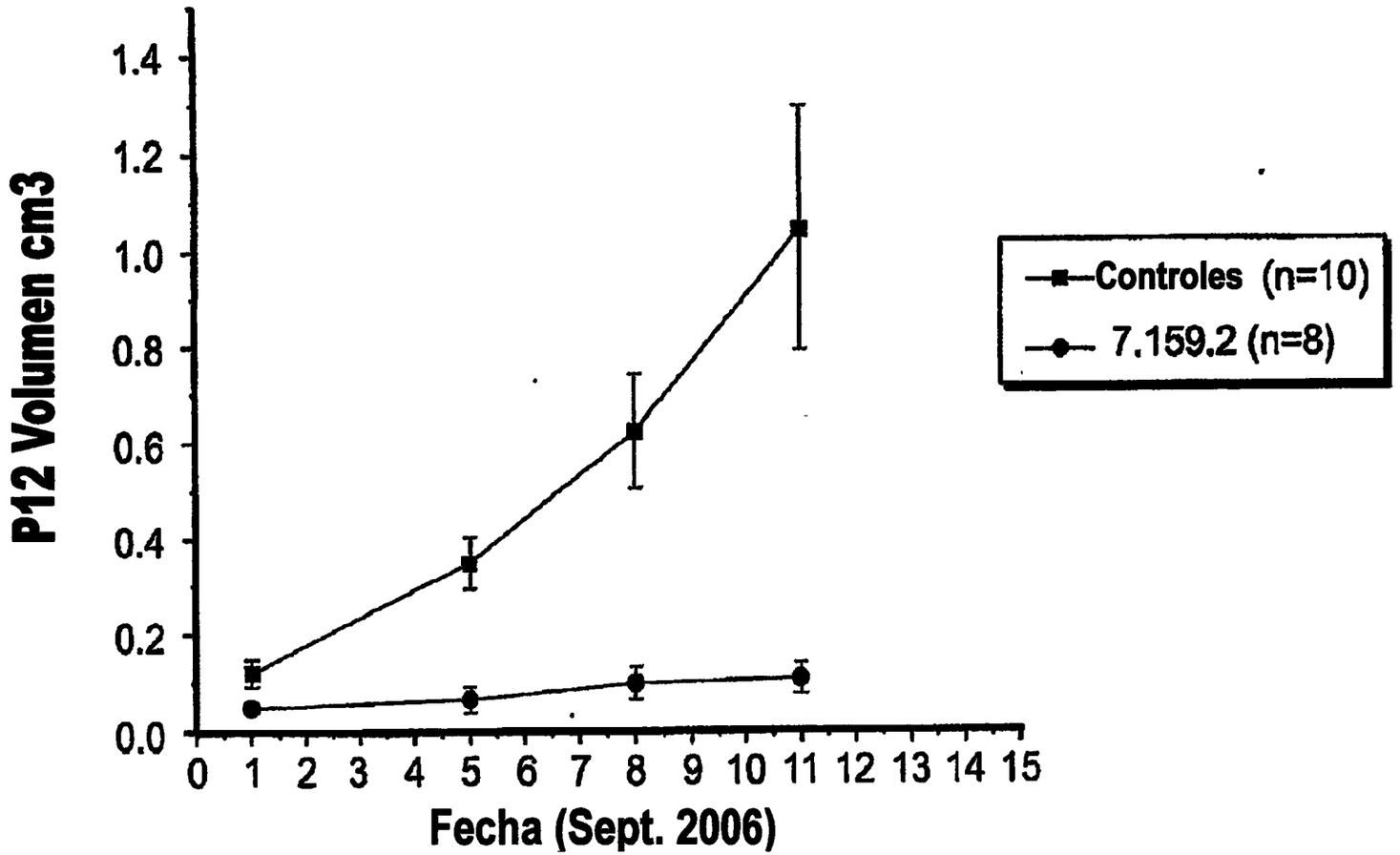


FIG. 3

2/4 241

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Raeber, Olivia
Gazit-Bornstein, Gadi
Yang, Xiaodong
Cartlidge, Susan Ann
Tonge, David William

<120> **PROTEÍNAS DE UNIÓN ESPECÍFICAS DE FACTORES DE CRECIMIENTO INSULINOIDES Y SUS USOS**

<130> ABXAZ.004VPC

<160> 102

<170> **FastSEQ for windows Version 4.0**

<210> 1
<211> 372
<212> ADN
<213> Human

<400> 1
cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagg agtagtagtt actactgggg ctggatccgc 120
cagccccag ggaaggggct ggagtggatt gggggtatct attatagtgg gagcacctac 180
tacaacccgt ctctcaagag tcgagtcacc atgtccgtag acacgtccaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgagctccgt gaccgccgca gacacggctg tgtattactg tgcgagacaa 300
aggggtcata gcagtggctg gtggtacttc gatctctggg gccgtggcac cctggtcact 360
gtctcctcag cc 372

<210> 2
<211> 124
<212> PRT
<213> Human

<400> 2
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Ser Ser
20 25 30
Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Gly Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Gln Arg Gly His Ser Ser Gly Trp Trp Tyr Phe Asp Leu
100 105 110
Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 3
<211> 324
<212> DNA
<213> Human

<400> 3
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagtgtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtca gggtattagc agctacttag cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcaatggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacaatt tcccattcac tttcggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa acga 324

<210> 4
<211> 108
<212> PRT
<213> Human

<400> 4
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Asn Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Asn Phe Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
100 105

<210> 5
<211> 363
<212> DNA
<213> Human

<400> 5
caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc agttatgata tcaactgggt gcgacaggcc 120
actggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atgaacccta acagtggtaa cacaggctat 180
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accaggaaca cctccataag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagaccct 300
tactactact actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 360
gcc 363

<210> 6
<211> 121
<212> PRT
<213> Human

<400> 6
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 7
<211> 336
<212> DNA
<213> Human

ABXAZ 004VPC (2).TXT

<400> 7
cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtc tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
tcctgctctg gaagcagctc caacattgag aataatcatg tatcctggta ccagcagctc 120
ccaggaacag cccccaaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
actggggacg aggccgatta ttactgcgaa acatgggata ccagcctgag tgctggccgg 300
gtattcggcg gagggaccaa gctgaccgtc ctaggt 336

<210> 8
<211> 112
<212> PRT
<213> Human

<400> 8
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Glu Asn Asn
20 25 30
His Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80
Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu Thr Trp Asp Thr Ser Leu
85 90 95
Ser Ala Gly Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 9
<211> 360
<212> DNA
<213> Human

<400> 9
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 120
ccagggaggg gactggagtg gattggctat ttcttttaca gtgggtacac caactacaac 180
ccctccctca agagtcgcgt caccatgtca gttgacacgt ccaagaacca gttctctctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgtg tataactgga 300
acgacgaagg ggggtatgga cgtctggggc caaggggcca cggtcaccgt ctcctcagcc 360

<210> 10
<211> 120
<212> PRT
<213> Human

<400> 10
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Phe Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Cys Ile Thr Gly Thr Thr Lys Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Ala Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 11
<211> 336
<212> DNA
<213> Human

<400> 11
cagtctgtgc tgacgcaggc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgcactg ggagaagttc caacatcggg gcaggttatg atgtacactg gtaccagcag 120
tttccaggaa cagccccaa actcctcatc tatggtaaca gcaatcggcc ctcaggggtc 180
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
caggctgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagtct gagtggttcg 300
gtattcggcg gagggaccaa gctgaccgtc ctaggt 336

<210> 12
<211> 112
<212> PRT
<213> Human

<400> 12
Gln Ser Val Leu Thr Gln Ala Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Arg Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30
Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45
Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 13
<211> 360
<212> DNA
<213> Human

<400> 13
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 120
ccagggaagg gactggagtg gattgggtat ttcttttaca gtgggtacac caactacaac 180
ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgtg tataactgga 300
acgacgaagg ggggtatgga cgtctggggc caagggacca cggtcaccgt ctcctcagcc 360

<210> 14
<211> 120
<212> PRT
<213> Human

<400> 14
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Phe Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Cys Ile Thr Gly Thr Thr Lys Gly Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly

244 245

100 105 110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 15
<211> 336
<212> DNA
<213> Human

<400> 15
cagtctgtac tgacgcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaccatc 60
tcctgcactg ggagcagctc caacatcggg gcaggttatg atgtacactg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagccccaa gctcctcatc tatggtaaca acaatcggcc ctcaggggtc 180
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
caggctgatg atgaggctga ttattactgc cagtcctttg acagcagtct gagtggttcg 300
gtattcggcg gagggaccaa gctgaccgtc ctaggt 336

<210> 16
<211> 112
<212> PRT
<213> Human

<400> 16
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30
Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45
Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80
Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Asp Ser Ser
85 90 95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 17
<211> 372
<212> DNA
<213> Human

<400> 17
cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcaac agtagtagta actactgggg ctggatccgc 120
cagccccag ggaagggact ggcgtggatt gggggcatct attatagtgg gagcacctac 180
tacaacccgt ccctcaggag tcgagtcacc atgtccgtag acacgtccaa gaaccagttc 240
tccctgaagc tgagctctgt gaccgccgca gacacggctg tatattactg tgcgagacaa 300
aggggtcata gcagtggctg gtggtacttc gatctctggg gccgtggcac cctggtcact 360
gtctcctcag cc 372

<210> 18
<211> 124
<212> PRT
<213> Human

<400> 18
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Asn Ser Ser
20 25 30
Ser Asn Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Ala
35 40 45
Trp Ile Gly Gly Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Arg Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Gln Arg Gly His Ser Ser Gly Trp Trp Tyr Phe Asp Leu
100 105 110
Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 19
<211> 324
<212> DNA
<213> Human

<400> 19
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgtc gggcgagtcg gggtattagc agctggttag cctggtatca gcagagacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatact gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccattcac tttcggccct 300
gggaccaaag tggatatcaa acga 324

<210> 20
<211> 108
<212> PRT
<213> Human

<400> 20
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Thr Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
100 105

<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> Human

<400> 21
Ser Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 22
<211> 16
<212> PRT
<213> Human

<400> 22
Tyr Phe Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 23
<211> 11
<212> PRT

<213> Human

<400> 23
Ile Thr Gly Thr Thr Lys Gly Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 24
<211> 14
<212> PRT
<213> Human

<400> 24
Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
1 5 10

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> Human

<400> 25
Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213> Human

<400> 26
Gln Ser Phe Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
1 5 10

<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> Human

<400> 27
Ser Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 28
<211> 16
<212> PRT
<213> Human

<400> 28
Tyr Phe Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> Human

<400> 29
Ile Thr Gly Thr Thr Lys Gly Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 30

<211> 14
<212> PRT
<213> Human

<400> 30
Thr Gly Arg Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
1 5 10

<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> Human

<400> 31
Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 32
<211> 11
<212> PRT
<213> Human

<400> 32
Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
1 5 10

<210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> Human

<400> 33
Ser Tyr Asp Ile Asn
1 5

<210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> Human

<400> 34
Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

<210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> Human

<400> 35
Asp Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 36
<211> 13
<212> PRT
<213> Human

<400> 36
Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Glu Asn Asn His Val Ser

1 5 10

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> Human

<400> 37
Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 38
<211> 12
<212> PRT
<213> Human

<400> 38
Glu Thr Trp Asp Thr Ser Leu Ser Ala Gly Arg Val
1 5 10

<210> 39
<211> 594
<212> DNA
<213> Human

<400> 39
accatgaaac atctgtggtt cttcctcctg ctggtggcgg ctcccagatg ggtcctgtcc 60
cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 120
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagg agtagtagtt actactgggg ctggatccgc 180
cagccccag ggaaggggct ggagtggatt gggggtatct attatagtgg gagcacctac 240
tacaacccgt ctctcaagag tcgagtcacc atgtccgtag acacgtccaa gaaccagttc 300
tccctgaagc tgagctccgt gaccgccgca gacacggctg tgtattactg tgcgagacaa 360
aggggtcata gcagtggctg gtggtacttc gatctctggg gccgtggcac cctggtcact 420
gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttccccc tggcgccctg ctccaggagc 480
acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 540
acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc agcggcgtgc acaccttccc agct 594

<210> 40
<211> 198
<212> PRT
<213> Human

<400> 40
Thr Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg
1 5 10 15
Trp Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
20 25 30
Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser
35 40 45
Ile Arg Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
50 55 60
Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser
85 90 95
Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr
100 105 110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Arg Gly His Ser Ser Gly Trp Trp
115 120 125
Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
130 135 140
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
145 150 155 160
Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
165 170 175

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
180 185 190
Val His Thr Phe Pro Ala
195

<210> 41
<211> 419
<212> DNA
<213> Human

<400> 41
atgagggtcc ctgctcagct cctggggctc ctgctgctct ggttcccagg ttccagatgc 60
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagtgtcacc 120
atcacttgtc gggcgagtca gggtattagc agctacttag cctggtatca gcagaaacca 180
gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 240
aggttcagcg gcaatggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 300
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacaatt tcccattcac tttcggccct 360
gggaccaaag tggatatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcc 419

<210> 42
<211> 139
<212> PRT
<213> Human

<400> 42
Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Phe Pro
1 5 10 15
Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser
20 25 30
Ala Ser Val Gly Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly
35 40 45
Ile Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
50 55 60
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80
Arg Phe Ser Gly Asn Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn
100 105 110
Asn Phe Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
115 120 125
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135

<210> 43
<211> 437
<212> DNA
<213> Human

<400> 43
accatggact ggacctggag gatcctcttc ttggtggcag cagctacaag tgcccactcc 60
caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 120
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc agttatgata tcaactgggt gcgacaggcc 180
actggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atgaacccta acagtggtaa cacaggctat 240
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accaggaaca cctccataag cacagcctac 300
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagaccct 360
tactactact actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 420
gcctccacca agggccc 437

<210> 44
<211> 145
<212> PRT
<213> Human

<400> 44
Thr Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr

ABXAZ 004VPC (2).TXT

```
 1               5                  10                  15
Ser Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
            20                  25                  30
Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
        35                  40                  45
Phe Thr Ser Tyr Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly
    50                  55                  60
Leu Glu Trp Met Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr
65                  70                  75                  80
Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile
                85                  90                  95
Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
            100                 105                 110
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
        115                 120                 125
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140
Gly
145
```

<210> 45
<211> 460
<212> DNA
<213> Human

<400> 45
atggcctggt ctcctctcct cctcaccctt ctcattcact gcacagggtc ctgggcccag 60
tctgtgttga cgcagccgcc ctcagtctct gcggccccag gacagaaggt caccatctcc 120
tgctctggaa gcagctccaa cattgagaat aatcatgtat cctggtacca gcagctccca 180
ggaacagccc ccaaactcct catttatgac aataataagc gaccctcagg gattcctgac 240
cgattctctg gctccaagtc tggcacgtca gccaccctgg gcatcaccgg actccagact 300
ggggacgagg ccgattatta ctgcgaaaca tgggatacca gcctgagtgc tggccgggta 360
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtcagccca aggctgcccc ctcggtcact 420
ctgttcccac cctcctctga ggagctccaa gccaacaagg 460

<210> 46
<211> 153
<212> PRT
<213> Human

<400> 46
```
Met Ala Trp Ser Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ile His Cys Thr Gly
 1               5                  10                  15
Ser Trp Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala
            20                  25                  30
Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile
        35                  40                  45
Glu Asn Asn His Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro
    50                  55                  60
Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp
65                  70                  75                  80
Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr
                85                  90                  95
Gly Leu Gln Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu Thr Trp Asp
            100                 105                 110
Thr Ser Leu Ser Ala Gly Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
        115                 120                 125
Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro
    130                 135                 140
Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys
145                 150
```

<210> 47
<211> 613
<212> DNA
<213> Human

<400> 47
accatgaaac atctgtggtt cttccttctc ctggtggcag ctcccagatg ggtcctgtcc 60
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 120
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 180
ccagggaggg gactggagtg gattggctat ttcttttaca gtgggtacac caactacaac 240
ccctccctca agagtcgcgt caccatgtca gttgacacgt ccaagaacca gttctctctg 300
aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgtg tataactgga 360
acgacgaagg ggggtatgga cgtctggggc caaggggcca cggtcaccgt ctcctcagcc 420
tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc 480
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540
aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtcctcagga 600
ctctactccc tca 613

<210> 48
<211> 204
<212> PRT
<213> Human

<400> 48
Thr Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg
1 5 10 15
Trp Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
20 25 30
Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser
35 40 45
Ile Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly
50 55 60
Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80
Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn
85 90 95
Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Cys Ile Thr Gly Thr Thr Lys Gly Gly Met Asp Val
115 120 125
Trp Gly Gln Gly Ala Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130 135 140
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
145 150 155 160
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
165 170 175
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
180 185 190
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
195 200

<210> 49
<211> 432
<212> DNA
<213> Human

<400> 49
cctctgctcc tcactctcct cgctcactgc acagggtcct gggcccagtc tgtgctgacg 60
caggcgccct cagtgtctgg ggccccaggg cagagggtca ccatctcctg cactgggaga 120
agttccaaca tcggggcagg ttatgatgta cactggtacc agcagtttcc aggaacagcc 180
cccaaactcc tcatctatgg taacagcaat cggccctcag gggtccctga ccgattctct 240
ggctccaagt ctggcacctc agcctccctg gccatcactg ggctccaggc tgaggatgag 300
gctgattatt actgccagtc ctatgacagc agtctgagtg gttcggtatt cggcggaggg 360
accaagctga ccgtcctagg tcagcccaag gctgcccccc cggtcactct gttcccgccc 420
tcctctgagg ag 432

<210> 50
<211> 144
<212> PRT
<213> Human

<400> 50
Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala His Cys Thr Gly Ser Trp Ala Gln
1 5 10 15
Ser Val Leu Thr Gln Ala Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg
20 25 30
Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Arg Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr
35 40 45
Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
50 55 60
Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
65 70 75 80
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
85 90 95
Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu
100 105 110
Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
115 120 125
Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
130 135 140

<210> 51
<211> 543
<212> DNA
<213> Human

<400> 51
atgaagcatc tgtggttctt ccttctcctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccct gtccctcacc 120
tgcactgtct ctggtggctc catcagtagt tactactgga gctggatccg gcagccccca 180
gggaagggac tggagtggat tgggtatttc ttttacagtg ggtacaccaa ctacaacccc 240
tccctcaaga gtcgagtcac catatcagta gacacgtcca agaaccagtt ctccctgaag 300
ctgagctctg tgaccgctgc ggacacggcc gtgtattact gtgcgtgtat aactggaacg 360
acgaaggggg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcagcctcc 420
accaagggcc catcggtctt ccccctggcg ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca 480
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 540
tca 543

<210> 52
<211> 181
<212> PRT
<213> Human

<400> 52
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
35 40 45
Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro
65 70 75 80
Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95
Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys Ala Cys Ile Thr Gly Thr Thr Lys Gly Gly Met Asp Val Trp
115 120 125
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
130 135 140
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
145 150 155 160
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
165 170 175
Val Ser Trp Asn Ser
180

<210> 53
<211> 451
<212> DNA
<213> Human

<400> 53
tcctctgctc ctcactctcc tcgctcactg cacagggtcc tgggcccagt ctgtactgac 60
gcagccgccc tcagtgtctg gggccccagg gcagagggtc accatctcct gcactgggag 120
cagctccaac atcggggcag gttatgatgt acactggtac cagcagcttc caggaacagc 180
ccccaagctc ctcatctatg gtaacaacaa tcggccctca ggggtccctg accgattctc 240
tggctccaag tctggcacct cagcctccct ggccatcact gggctccagg ctgatgatga 300
ggctgattat tactgccagt cctttgacag cagtctgagt ggttcggtat tcggcggagg 360
gaccaagctg accgtcctag gtcagcccaa ggctgccccc tcggtcactc tgttcccgcc 420
ctcctctgag gagctccaag ccaacaagga a 451

<210> 54
<211> 145
<212> PRT
<213> Human

<400> 54
Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala His Cys Thr Gly Ser Trp Ala Gln
1 5 10 15
Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg
20 25 30
Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr
35 40 45
Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
50 55 60
Ile Tyr Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
65 70 75 80
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
85 90 95
Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Asp Ser Ser Leu
100 105 110
Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
115 120 125
Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
130 135 140
Leu
145

<210> 55
<211> 559
<212> DNA
<213> Human

<400> 55
accatgaaac atctgtggtt cttcctcctg ctggtggcgg ctcccagatg ggtcctgtcc 60
cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 120
acctgcactg tctctggtgg ctccatcaac agtagtagta actactgggg ctggatccgc 180
cagccccag ggaagggact ggcgtggatt gggggcatct attatagtgg gagcacctac 240
tacaacccgt ccctcaggag tcgagtcacc atgtccgtag acacgtccaa gaaccagttc 300
tccctgaagc tgagctctgt gaccgccgca gacacggctg tatattactg tgcgagacaa 360
aggggtcata gcagtggctg gtggtacttc gatctctggg gccgtggcac cctggtcact 420
gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttccccc tggcgccctg ctccaggagc 480
acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 540
acggtgtcgt ggaactcag 559

<210> 56
<211> 186
<212> PRT
<213> Human

<400> 56

```
Thr Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg
 1               5                  10                  15
Trp Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
            20                  25                  30
Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser
        35                  40                  45
Ile Asn Ser Ser Ser Asn Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
    50                  55                  60
Lys Gly Leu Ala Trp Ile Gly Gly Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr
65                  70                  75                  80
Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser
                85                  90                  95
Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr
            100                 105                 110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Arg Gly His Ser Ser Gly Trp Trp
        115                 120                 125
Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
    130                 135                 140
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
145                 150                 155                 160
Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
                165                 170                 175
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
            180                 185
```

<210> 57
<211> 532
<212> DNA
<213> Human

<400> 57
atgagggtcc ccgctcagct cctggggctc ctgctgctct ggttcccagg ttccagatgc 60
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 120
atcacttgtc gggcgagtcg gggtattagc agctggttag cctggtatca gcagagacca 180
gggaaagccc ctaagctcct gatctatact gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 240
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 300
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccattcac tttcggccct 360
gggaccaaag tggatatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 420
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg ta 532

<210> 58
<211> 177
<212> PRT
<213> Human

<400> 58
```
Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Phe Pro
 1               5                  10                  15
Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser
            20                  25                  30
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Gly
        35                  40                  45
Ile Ser Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro
    50                  55                  60
Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
65                  70                  75                  80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
                85                  90                  95
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn
            100                 105                 110
Ser Phe Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
        115                 120                 125
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
    130                 135                 140
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145                 150                 155                 160
```

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175
Gly

<210> 59
<211> 594
<212> DNA
<213> Human

<400> 59
accatgaaac atctgtggtt cttcctcctg ctggtggcgg ctcccagatg ggtcctgtcc 60
cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 120
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtagtagtt actactgggg ctggatccgc 180
cagccccag ggaaggggct ggagtggatt gggggtatct attatagtgg gagcacctac 240
tacaacccgt ctctcaagag tcgagtcatc atgtccgtag acacgtccaa gaaccagttc 300
tccctgaagc tgagctccgt gaccgccgca gacacggctg tgtattactg tgcgagacaa 360
aggggtcata gcagtggctg gtggtacttc gatctctggg gccgtggcac cctggtcact 420
gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttccccc tggcgccctg ctccaggagc 480
acctccgaga gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 540
acggtgtcgt ggaactcagg cgctctgacc agcggcgtgc acaccttccc agct 594

<210> 60
<211> 198
<212> PRT
<213> Human

<400> 60
Thr Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg
1 5 10 15
Trp Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
20 25 30
Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser
35 40 45
Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly
50 55 60
Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser
85 90 95
Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr
100 105 110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Arg Gly His Ser Ser Gly Trp Trp
115 120 125
Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
130 135 140
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser
145 150 155 160
Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
165 170 175
Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
180 185 190
Val His Thr Phe Pro Ala
195

<210> 61
<211> 419
<212> DNA
<213> Human

<400> 61
atgagggtcc ctgctcagct cctggggctc ctgctgctct ggttcccagg ttccagatgc 60
gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 120
atcacttgtc gggcgagtca gggtattagc agctacttag cctggtatca gcagaaacca 180
gggaaagccc ctaaactcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 240
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 300

gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacaatt tcccattcac tttcggccct 360
gggaccaaag tggatatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcc 419

<210> 62
<211> 139
<212> PRT
<213> Human

<400> 62
Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Phe Pro
1 5 10 15
Gly Ser Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser
20 25 30
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly
35 40 45
Ile Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
50 55 60
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn
100 105 110
Asn Phe Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
115 120 125
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135

<210> 63
<211> 437
<212> DNA
<213> Human

<400> 63
accatggact ggacctggag gatcctcttc ttggtggcag cagctacaag tgcccactcc 60
caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 120
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc agttatgata tcaactgggt gcgacaggcc 180
actggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atgaacccta acagtggtaa cacaggctat 240
gcacagaagt tccagggcag agtcaccatg accagggaca cctccataag cacagcctac 300
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagaccct 360
tactactact actacggtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca 420
gcctccacca agggccc 437

<210> 64
<211> 145
<212> PRT
<213> Human

<400> 64
Thr Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr
1 5 10 15
Ser Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys
20 25 30
Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr
35 40 45
Phe Thr Ser Tyr Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly
50 55 60
Leu Glu Trp Met Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr
65 70 75 80
Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile
85 90 95
Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
100 105 110
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
115 120 125
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140

Gly
145

<210> 65
<211> 460
<212> DNA
<213> Human

<400> 65
atggcctggt ctcctctcct cctcaccctt ctcattcact gcacagggtc ctgggcccag 60
tctgtgttga cgcagccgcc ctcagtctct gcggccccag gacagaaggt caccatctcc 120
tgctctggaa gcagctccaa cattgagaat aatcatgtat cctggtacca gcagctccca 180
ggaacagccc ccaaactcct catttatgac aataataagc gaccctcagg gattcctgac 240
cgattctctg gctccaagtc tggcacgtca gccaccctgg gcatcaccgg actccagact 300
ggggacgagg ccgattatta ctgcgaaaca tgggatacca gcctgagtgc tggccgggta 360
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggtcagccca aggctgcccc ctcggtcact 420
ctgttcccac cctcctctga ggagctccaa gccaacaagg 460

<210> 66
<211> 153
<212> PRT
<213> Human

<400> 66
Met Ala Trp Ser Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ile His Cys Thr Gly
 1   5   10   15
Ser Trp Ala Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala
            20   25   30
Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile
        35   40   45
Glu Asn Asn His Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro
    50   55   60
Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp
65   70   75   80
Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr
                85   90   95
Gly Leu Gln Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Glu Thr Trp Asp
            100   105   110
Thr Ser Leu Ser Ala Gly Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr
        115   120   125
Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro
    130   135   140
Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys
145   150

<210> 67
<211> 613
<212> DNA
<213> Human

<400> 67
accatgaaac atctgtggtt cttccttctc ctggtggcag ctcccagatg ggtcctgtcc 60
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 120
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 180
ccagggaagg gactggagtg gattggctat ttctttttaca gtgggtacac caactacaac 240
ccctccctca agagtcgcgt caccatctca gttgacacgt ccaagaacca gttctctctg 300
aagctgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgcg tataactgga 360
acgacgaagg ggggtatgga cgtctggggc caagggacca cggtcaccgt ctcctcagcc 420
tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc 480
acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540
aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtcctcagga 600
ctctactccc tca 613

<210> 68
<211> 204
<212> PRT

<213> Human

<400> 68
Thr Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg
1 5 10 15
Trp Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val
20 25 30
Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser
35 40 45
Ile Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly
50 55 60
Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80
Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn
85 90 95
Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Thr Gly Thr Thr Lys Gly Gly Met Asp Val
115 120 125
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130 135 140
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
145 150 155 160
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
165 170 175
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
180 185 190
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
195 200

<210> 69
<211> 432
<212> DNA
<213> Human

<400> 69
cctctgctcc tcactctcct cgctcactgc acagggtcct gggcccagtc tgtgctgacg 60
cagccgccct cagtgtctgg ggccccaggg cagagggtca ccatctcctg cactgggaga 120
agttccaaca tcggggcagg ttatgatgta cactggtacc agcagttgcc aggaacagcc 180
cccaaactcc tcatctatgg taacagcaat cggccctcag gggtccctga ccgattctct 240
ggctccaagt ctggcacctc agcctccctg gccatcactg ggctccaggc tgaggatgag 300
gctgattatt actgccagtc ctatgacagc agtctgagtg gttcggtatt cggcggaggg 360
accaagctga ccgtcctagg tcagcccaag gctgcccccct cggtcactct gttcccgccc 420
tcctctgagg ag 432

<210> 70
<211> 144
<212> PRT
<213> Human

<400> 70
Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala His Cys Thr Gly Ser Trp Ala Gln
1 5 10 15
Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg
20 25 30
Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Arg Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr
35 40 45
Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
50 55 60
Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
65 70 75 80
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
85 90 95
Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu
100 105 110
Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
115 120 125

Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
130 135 140

<210> 71
<211> 543
<212> DNA
<213> Human

<400> 71
atgaagcatc tgtggttctt ccttctcctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccct gtccctcacc 120
tgcactgtct ctggtggctc catcagtagt tactactgga gctggatccg gcagccccca 180
gggaagggac tggagtggat tgggtatttc ttttacagtg ggtacaccaa ctacaacccc 240
tccctcaaga gtcgagtcac catatcagta gacacgtcca agaaccagtt ctccctgaag 300
ctgagctctg tgaccgctgc ggacacggcc gtgtattact gtgcgcgtat aactggaacg 360
acgaaggggg gtatggacgt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctcagcctcc 420
accaagggcc catcggtctt ccccctggcg ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca 480
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 540
tca 543

<210> 72
<211> 181
<212> PRT
<213> Human

<400> 72
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1 5 10 15
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
20 25 30
Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile
35 40 45
Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Ile Gly Tyr Phe Phe Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Pro
65 70 75 80
Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95
Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys Ala Arg Ile Thr Gly Thr Thr Lys Gly Gly Met Asp Val Trp
115 120 125
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
130 135 140
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr
145 150 155 160
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
165 170 175
Val Ser Trp Asn Ser
180

<210> 73
<211> 451
<212> DNA
<213> Human

<400> 73
tcctctgctc ctcactctcc tcgctcactg cacagggtcc tgggcccagt ctgtactgac 60
gcagccgccc tcagtgtctg gggccccagg gcagagggtc accatctcct gcactgggag 120
cagctccaac atcggggcag gttatgatgt acactggtac cagcagcttc caggaacagc 180
ccccaagctc ctcatctatg gtaacaacaa tcggccctca ggggtccctg accgattctc 240
tggctccaag tctggcacct cagcctccct ggccatcact gggctccagg ctgaagatga 300
ggctgattat tactgccagt cctttgacag cagtctgagt ggttcggtat tcggcggagg 360
gaccaagctg accgtcctag gtcagcccaa ggctgccccc tcggtcactc tgttcccgcc 420
ctcctctgag gagctccaag ccaacaagga a 451

<210> 74
<211> 145
<212> PRT
<213> Human

<400> 74
Pro Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala His Cys Thr Gly Ser Trp Ala Gln
1 5 10 15
Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg
20 25 30
Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr
35 40 45
Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
50 55 60
Ile Tyr Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
65 70 75 80
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
85 90 95
Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Asp Ser Ser Leu
100 105 110
Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
115 120 125
Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
130 135 140
Leu
145

<210> 75
<211> 119
<212> PRT
<213> Human

<400> 75
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
115

<210> 76
<211> 110
<212> PRT
<213> Human

<400> 76
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30
Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95
Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 77
<211> 118
<212> PRT
<213> Human

<400> 77
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30
Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80
Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Ser Ser Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala
115

<210> 78
<211> 108
<212> PRT
<213> Human

<400> 78
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
100 105

<210> 79
<211> 117
<212> PRT
<213> Human

<400> 79
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Ile Thr Gly Thr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser Ala
115

<210> 80
<211> 112
<212> PRT
<213> Human

<400> 80
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30
Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45
Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95
Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 81
<211> 7
<212> PRT
<213> Human

<400> 81
Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5

<210> 82
<211> 16
<212> PRT
<213> Human

<400> 82
Gly Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 83
<211> 13
<212> PRT
<213> Human

<400> 83
Gln Arg Gly His Ser Ser Gly Trp Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 84
<211> 11
<212> PRT
<213> Human

<400> 84
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 85
<211> 7
<212> PRT
<213> Human

<400> 85
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 86
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 86
Gln Gln Ala Asn Asn Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 87
<211> 7
<212> PRT
<213> Human

<400> 87
Ser Ser Ser Asn Tyr Trp Gly
1 5

<210> 88
<211> 16
<212> PRT
<213> Human

<400> 88
Gly Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser
1 5 10 15

<210> 89
<211> 13
<212> PRT
<213> Human

<400> 89
Gln Arg Gly His Ser Ser Gly Trp Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 90
<211> 11
<212> PRT
<213> Human

<400> 90
Arg Ala Ser Arg Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 91
<211> 7
<212> PRT
<213> Human

<400> 91

Thr Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 92
<211> 9
<212> PRT
<213> Human

<400> 92
Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 93
<211> 25
<212> PRT
<213> Human

<400> 93
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 94
<211> 10
<212> PRT
<213> Human

<400> 94
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asp Ile Asn
1 5 10

<210> 95
<211> 25
<212> PRT
<213> Human

<400> 95
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 96
<211> 12
<212> PRT
<213> Human

<400> 96
Gly Gly Ser Ile Arg Ser Ser Ser Tyr Tyr Trp Gly
1 5 10

<210> 97
<211> 25
<212> PRT
<213> Human

<400> 97
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 98
<211> 12
<212> PRT
<213> Human

<400> 98
Gly Gly Ser Ile Asn Ser Ser Ser Asn Tyr Trp Gly
1 5 10

<210> 99
<211> 25
<212> PRT
<213> Human

<400> 99
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 100
<211> 10
<212> PRT
<213> Human

<400> 100
Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser
1 5 10

<210> 101
<211> 25
<212> PRT
<213> Human

<400> 101
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 102
<211> 10
<212> PRT
<213> Human

<400> 102
Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser
1 5 10

PCT REQUEST

Original (for **SUBMISSION**)

0	**For receiving Office use only**	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	**Form PCT/RO/101 PCT Request**	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.51.009.184 MT/FOP 20060701/0.20.5
0-5	**Petition** The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	**Receiving Office (specified by the applicant)**	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	**Applicant's or agent's file reference**	ABXAZ.004VPC
I	**Title of Invention**	BINDING PROTEINS SPECIFIC FOR INSULIN-LIKE GROWTH FACTORS AND USES THEREOF
II	**Applicant**	
II-1	This person is	applicant only.
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	AMGEN FREMONT INC.
II-5	Address	6701 Kaiser Drive Fremont, California 94555 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
III-1	**Applicant and/or inventor**	
III-1-1	This person is	applicant only
III-1-2	Applicant for	all designated States except US
III-1-4	Name	ASTRAZENECA AB
III-1-5	Address	Sodertalje, SE-151 85 Sweden
III-1-6	State of nationality	
III-1-7	State of residence	SE

III-2	Applicant and/or Inventor	
III-2-1	This person is	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	RAEBER, Olivia
III-2-5	Address	990 Glennan Dr. Redwood City, California 94061 United States of America
III-2-6	State of nationality	FR
III-2-7	State of residence	US
III-3	Applicant and/or Inventor	
III-3-1	This person is	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	GAZIT-BORNSTEIN, Gadi
III-3-5	Address	10 Museum Way, #1526 Cambdrige, Massachusetts 02141 United States of America
III-3-6	State of nationality	US
III-3-7	State of residence	US
III-4	Applicant and/or Inventor	
III-4-1	This person is	applicant and inventor
III-4-2	Applicant for	US only
III-4-4	Name (LAST, First)	YANG, Xiaodong
III-4-5	Address	250 El Dorado Avenue Palo Alto, California 94306 United States of America
III-4-6	State of nationality	US
III-4-7	State of residence	US
III-5	Applicant and/or Inventor	
III-5-1	This person is	applicant and inventor
III-5-2	Applicant for	US only
III-5-4	Name (LAST, First)	CARTLIDGE, Susan Ann
III-5-5	Address	Mereside, Alderly Park Macclesfield Cheshire SK10 4TG United Kingdom
III-5-6	State of nationality	GB
III-5-7	State of residence	GB

III-6	**Applicant and/or inventor**	
III-6-1	This person is	applicant and inventor
III-6-2	Applicant for	US only
III-6-4	Name (LAST, First)	TONGE, David William
III-6-5	Address	Mereside, Alderly Park Macclesfield Cheshire SK10 4TG United Kingdom
III-6-6	State of nationality	GB
III-6-7	State of residence	GB
IV-1	**Agent or common representative; or address for correspondence** The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	FULLER, Michael L.
IV-1-2	Address	KNOBBE MARTENS OLSON & BEAR LLP 2040 Main Street, Fourteenth Floor Irvine, California 92614 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	(949) 760-0404
IV-1-4	Facsimile No.	(949) 760-9502
IV-1-5	e-mail	instructions@kmob.com
IV-1-6	Agent's registration No.	36,516
V	**DESIGNATIONS**	
V-1	**The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.**	
VI-1	**Priority claim of earlier national application**	
VI-1-1	Filing date	13 December 2005 (13.12.2005)
VI-1-2	Number	60/750,085
VI-1-3	Country	US
VI-2	**Priority claim of earlier national application**	
VI-2-1	Filing date	14 December 2005 (14.12.2005)
VI-2-2	Number	60/750,772
VI-2-3	Country	US
VI-3	**Priority claim of earlier national**	

	application		
VI-3-1	Filing date	17 February 2006 (17.02.2006)	
VI-3-2	Number	60/774,747	
VI-3-3	Country	US	
VI-4	Priority claim of earlier national application		
VI-4-1	Filing date	24 May 2006 (24.05.2006)	
VI-4-2	Number	60/808,183	
VI-4-3	Country	US	
VI-5	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1, VI-2, VI-3, VI-4	
VII-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)	
VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	1	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	

VIII-4-1	**Declaration: Inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)** Declaration of Inventorship (Rules 4.17(iv) and 51bis.1(a)(iv)) for the purposes of the designation of the United States of America:	I hereby declare that I believe I am the original, first and sole (if only one inventor is listed below) or joint (if more than one inventor is listed below) inventor of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought. This declaration is directed to the international application of which it forms a part (if filing declaration with application). This declaration is directed to international application No. PCT/ . . . . . (if furnishing declaration pursuant to Rule 26ter). I hereby declare that my residence, mailing address, and citizenship are as stated next to my name. I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above-identified international application, including the claims of said application. I have identified in the request of said application, in compliance with PCT Rule 4.10, any claim to foreign priority, and I have identified below, under the heading "Prior Applications", by application number, country or Member of the World Trade Organization, day, month, and year of filing, any application for a patent or inventor's certificate filed in a country other than the United States of America, including any PCT international application designating at least one country other than the United States of America, having a filing date before that of the application on which foreign priority is claimed.
VIII-4-1-1	Prior applications:	60/750,085, US, 13 December 2005 (13.12.2005) ;60/750,772, US, 14 December 2005 (14.12.2005) ;60/774,747,

		US, 17 February 2006 (17.02.2006) ; 60/808,183, US, 24 May 2006 (24.05.2006)
		I hereby acknowledge the duty to disclose information that is known by me to be material to patentability as defined by 37 C.F.R. § 1.56, including for continuation-in-part applications, material information which became available between the filing date of the prior application and the PCT international filing date of the continuation-in-part application. I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.
VIII-4-1-1-1	Name (LAST, First)	RAEBER, Olivia
VIII-4-1-1-2	Residence: (city and either US State, if applicable, or country)	Redwood City, California
VIII-4-1-1-3	Mailing address:	990 Glennan Dr. Redwood City, CA 94061 United States of America
VIII-4-1-1-4	Citizenship:	FR
VIII-4-1-1-5	Inventor's Signature: (The signature must be that of the inventor, not that of the agent)	
VIII-4-1-1-6	Date:	

VIII-4-1-2-1	Name (LAST, First)	GAZIT-BORNSTEIN, Gadi
VIII-4-1-2-2	Residence: (city and either US State, if applicable, or country)	Cambdrige, Massachusetts
VIII-4-1-2-3	Mailing address:	10 Museum Way, #1526 Cambdrige, MA 02141 United States of America
VIII-4-1-2-4	Citizenship:	US
VIII-4-1-2-5	Inventor's Signature: (The signature must be that of the inventor, not that of the agent)	
VIII-4-1-2-6	Date	
VIII-4-1-3-1	Name (LAST, First)	YANG, Xiaodong
VIII-4-1-3-2	Residence: (city and either US State, if applicable, or country)	Palo Alto, California
VIII-4-1-3-3	Mailing address:	250 El Dorado Avenue Palo Alto, CA 94306 United States of America
VIII-4-1-3-4	Citizenship:	US
VIII-4-1-3-5	Inventor's Signature: (The signature must be that of the inventor, not that of the agent)	
VIII-4-1-3-6	Date	
VIII-4-1-4-1	Name (LAST, First)	CARTLIDGE, Susan Ann
VIII-4-1-4-2	Residence: (city and either US State, if applicable, or country)	United Kingdom
VIII-4-1-4-3	Mailing address:	Mereside, Alderly Park , Cheshire SK10 4TG United Kingdom
VIII-4-1-4-4	Citizenship:	GB
VIII-4-1-4-5	Inventor's Signature: (The signature must be that of the inventor, not that of the agent)	
VIII-4-1-4-6	Date	

PCT REQUEST

Original (for **SUBMISSION**)

VIII-4-1-5-1	Name (LAST, First)	TONGE, David William
VIII-4-1-5-2	Residence: (city and either US State, if applicable, or country)	Macclesfield, United Kingdom
VIII-4-1-5-3	Mailing address:	Mereside, Alderly Park Macclesfield, Cheshire SK10 4TG United Kingdom
VIII-4-1-5-4	Citizenship:	GB
VIII-4-1-5-5	Inventor's Signature: (The signature must be that of the inventor, not that of the agent)	
VIII-4-1-5-6	Date	

ABXAZ.004VPC

9/10

PCT REQUEST

Original (for **SUBMISSION**)

IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	10	✓
IX-2	Description (excluding sequence listing part)	77	-
IX-3	Claims	6	-
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	3	-
IX-7a	Sub-total number of sheets	97	
IX-6a	Sequence listing part of description	26	-
IX-7	TOTAL	123	
	Accompanying Items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-16(A)	Sequence listing in electronic form		
IX-16(A)-(ii)	additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter	-	1 Diskette
IX-17	PCT-SAFE physical media	-	✓
IX-19	**Figure of the drawings which should accompany the abstract**	1	
IX-20	**Language of filing of the international application**	English	
X-1	**Signature of applicant, agent or common representative**		
X-1-1	Name (LAST, First)	FULLER, Michael L.	
X-1-2	Name of signatory		
X-1-3	Capacity		

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	**Date of actual receipt of the purported international application**	
10-2	**Drawings:**	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	**Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application**	
10-4	**Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)**	
10-5	**International Searching Authority**	ISA/EP
10-6	**Transmittal of search copy delayed until search fee is paid**	

ABXAZ.004VPC

PCT REQUEST

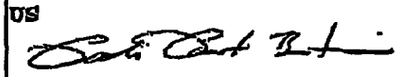
Original (for **SUBMISSION**)

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	**Date of receipt of the record copy by the International Bureau**	

107504.

VIII-4-1	Declaration: Inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America) Declaration of Inventorship (Rules 4.17(iv) and 51bis.1(a)(iv)) for the purposes of the designation of the United States of America:	I hereby declare that I believe I am the original, first and sole (if only one inventor is listed below) or joint (if more than one inventor is listed below) inventor of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought. This declaration is directed to the international application of which it forms a part (if filing declaration with application). This declaration is directed to international application No. PCT/ . . . . . (if furnishing declaration pursuant to Rule 26ter). I hereby declare that my residence, mailing address, and citizenship are as stated next to my name. I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above-identified international application, including the claims of said application. I have identified in the request of said application, in compliance with PCT Rule 4.10, any claim to foreign priority, and I have identified below, under the heading "Prior Applications", by application number, country or Member of the World Trade Organization, day, month, and year of filing, any application for a patent or inventor's certificate filed in a country other than the United States of America, including any PCT international application designating at least one country other than the United States of America, having a filing date before that of the application on which foreign priority is claimed.
VIII-4-1-1	Prior applications:	60/750,085, US, 13 December 2005 (13.12.2005) ;60/750,772, US, 14 December 2005 (14.12.2005) ;60/774,747, US, 17 February 2006 (17.02.2006) ; 60/808,183, US, 24 May 2006 (24.05.2006)
		I hereby acknowledge the duty to disclose information that is known by me to be material to patentability as defined by 37 C.F.R. § 1.56, including

		for continuation-in-part applications, material information which became available between the filing date of the prior application and the PCT international filing date of the continuation-in-part application. I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.
VIII-4-1-1-1	Name (LAST, First)	RAEBER, Olivia
VIII-4-1-1-2	Residence: (city and either US State, if applicable, or country)	Redwood City, California
VIII-4-1-1-3	Mailing address:	990 Glennan Dr. Redwood City, CA 94061 United States of America
VIII-4-1-1-4	Citizenship:	FR
VIII-4-1-1-5	Inventor's Signature: (The signature must be that of the inventor, not that of the agent)	
VIII-4-1-1-6	Date:	Feb 14, 07
VIII-4-1-2-1	Name (LAST, First)	GAZIT-BORNSTEIN, Gadi
VIII-4-1-2-2	Residence: (city and either US State, if applicable, or country)	Cambdrige, Massachusetts
VIII-4-1-2-3	Mailing address:	10 Museum Way, #1526 Cambdrige, MA 02141 United States of America
VIII-4-1-2-4	Citizenship:	US
VIII-4-1-2-5	Inventor's Signature: (The signature must be that of the inventor, not that of the agent)	
VIII-4-1-2-6	Date	Feb. 20, 2007

VIII-4-1-3-1	Name (LAST, First)	YANG, Xiaodong
VIII-4-1-3-2	Residence: (city and either US State, if applicable, or country)	Palo Alto, California
VIII-4-1-3-3	Mailing address:	250 El Dorado Avenue Palo Alto, CA 94306 United States of America
VIII-4-1-3-4	Citizenship:	US
VIII-4-1-3-5	Inventor's Signature: (The signature must be that of the inventor, not that of the agent)	Xiaodongyang
VIII-4-1-3-6	Date	February 19, 2007
VIII-4-1-4-1	Name (LAST, First)	CARTLIDGE, Susan Ann
VIII-4-1-4-2	Residence: (city and either US State, if applicable, or country)	United Kingdom
VIII-4-1-4-3	Mailing address:	Mereside, Alderly Park , Cheshire SK10 4TG United Kingdom
VIII-4-1-4-4	Citizenship:	GB
VIII-4-1-4-5	Inventor's Signature: (The signature must be that of the inventor, not that of the agent)	
VIII-4-1-4-6	Date	
VIII-4-1-5-1	Name (LAST, First)	TONGE, David William
VIII-4-1-5-2	Residence: (city and either US State, if applicable, or country)	Macclesfield, United Kingdom
VIII-4-1-5-3	Mailing address:	Mereside, Alderly Park Macclesfield, Cheshire SK10 4TG United Kingdom
VIII-4-1-5-4	Citizenship:	GB
VIII-4-1-5-5	Inventor's Signature: (The signature must be that of the inventor, not that of the agent)	
VIII-4-1-5-6	Date	

VIII-4-1-3-1	Name (LAST, First)	YANG, Xiaodong
VIII-4-1-3-2	Residence: (city and either US State, if applicable, or country)	Palo Alto, California
VIII-4-1-3-3	Mailing address:	250 El Dorado Avenue Palo Alto, CA 94306 United States of America
VIII-4-1-3-4	Citizenship:	US
VIII-4-1-3-5	Inventor's Signature: (The signature must be that of the inventor, not that of the agent)	
VIII-4-1-3-6	Date	
VIII-4-1-4-1	Name (LAST, First)	CARTLIDGE, Susan Ann
VIII-4-1-4-2	Residence: (city and either US State, if applicable, or country)	United Kingdom
VIII-4-1-4-3	Mailing address:	Mereside, Alderly Park , Cheshire SK10 4TG United Kingdom
VIII-4-1-4-4	Citizenship:	GB
VIII-4-1-4-5	Inventor's Signature: (The signature must be that of the inventor, not that of the agent)	S A Cartlidge
VIII-4-1-4-6	Date	
VIII-4-1-5-1	Name (LAST, First)	TONGE, David William
VIII-4-1-5-2	Residence: (city and either US State, if applicable, or country)	Macclesfield, United Kingdom
VIII-4-1-5-3	Mailing address:	Mereside, Alderly Park Macclesfield, Cheshire SK10 4TG United Kingdom
VIII-4-1-5-4	Citizenship:	GB
VIII-4-1-5-5	Inventor's Signature: (The signature must be that of the inventor, not that of the agent)	
VIII-4-1-5-6	Date	

Brigard & Castro

BOGOTA - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros)

domiciliado(s) en

Nombro(amos) a: **RAMIRO CASTRO DUQUE** y/o **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **BEATRIZ JARAMILLO S.**
de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseñas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros) intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **RAMIRO CASTRO DUQUE** y/o **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **BEATRIZ JARAMILLO S.**
domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de 200_

Firma

Nombre
Cargo

POWER OF ATTORNEY

I (We) ASTRAZENECA AB

domiciled in SE-151 Sodertalje, Sweden

Hereby appoint **RAMIRO CASTRO DUQUE** and/or **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **BEATRIZ JARAMILLO S.**
of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or explotation of licenses, action of unfair competition; penal demands, actions of indemnities for damages: claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures: and in other actions or similar proceedings.

To that effect they are hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kind of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm acts, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoint **RAMIRO CASTRO DUQUE** and/or **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **BEATRIZ JARAMILLO S.**
domiciled in Carrera 7 No. 16-56, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Granted and signed in Macclesfield, Cheshire, England

this 18th day of July 2003

Signature

Name KEVIN BILL
Title Director, IP Services

120816

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
04 MAR. 2008
NOTARIO CUARENTA (E)
Bogotá, D.C. Colombia
Notario Fernando Ramírez

2 2 282

APOSTILLE
(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
   Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

   This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by / a été signé par: **J B Hodgson**

3. Acting in the capacity of / agissant en qualité de: **Notary Public**

4. Bears the seal/stamp of / est revêtu du sceau/timbre de: **The Said Notary Public**

Certified/Attesté

5. at London/à Londres

6. the/le **17 February 2004**

7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
   par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No **G348987**

9. Stamp: / timbre:

10. Signature: **J. Ireland**

FOREIGN AND COMMONWEALTH OFFICE LONDON

For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country.

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.

0 4 MAR. 2008

NOTARIO CUARENTA (E)
Bogotá, D.C. - Colombia
Norby Fernando Mora S.

TRADUCCIÓN SIMPLE AL ESPAÑOL del la Apostilla que vienen junto con el Certificado Notarial (Sociedad) y el **Poder** concedido por **ASTRAZENECA AB**, domiciliada en SE - 151 Sodertalje, Suecia a **Ramiro Castro Duque** y/o **Juan Pablo Cadena Sarmiento** y/o **Beatriz Jaramillo S**, domiciliados en la Carrera 7 #16-56, P. 9, Bogotá D.C., Colombia.

AUTENTICACIÓN

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. País: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
2. Este documento público
   ha sido firmado por **J. B. Hodgson**
3. actuando en capacidad de **Notario Público**
4. lleva el sello de: **Dicho Notario Público**

CERTIFICADO

5. en Londres 6. el **17 de Febrero de 2004**
7. por El secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y de la Comunidad
8. No. **G348987**
9. Sello 10. Firma

J. Ireland (Firma)

Si este documento va a ser utilizado en un país que no es parte de la Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961, debe ser presentado a la sección consular de la misión que representa a ese país.



284

REPÚBLICA DE COLOMBIA

GAVIRIA

ORGANIZACION ELECTORAL
REGISTRADURÍA NACIONAL DEL ESTADO CIVIL

REGISTRO CIVIL DE DEFUNCIÓN

Indicativo Serial 5562241

Datos de la oficina de registro

Clase de oficina: Registraduría		Notaría	X	Consulado		Corregimiento		Insp. de Policía		Código	9795

País - Departamento - Municipio - Corregimiento e/o Inspección de Policía

COLOMBIA CUNDINAMARCA BOGOTA D..C NOTARIA 32.

Datos del inscrito

Apellidos y nombres completos: CASTRO DUQUE RAMIRO

Documento de identificación (Clase y número)	Sexo (en Letras)
C.C. No. 170322 DE BOGOTA ----------	MASCULINO

Datos de la defunción

Lugar de la Defunción: País - Departamento - Municipio - Corregimiento e/o Inspección de Policía

COLOMBIA CUNDINAMARCA BOGOTA D.C.

Fecha de la defunción	Hora	Número de certificado de defunción
Año 2004 Mes 10 Día 30	04:10 PM	A- 2094375.

Presunción de muerte

Juzgado que profiere la sentencia	Fecha de la sentencia
------------------	Año Mes Día

Documento presentado		Nombre y cargo del funcionario
Autorización judicial [ ]	Certificado Médico [X]	ANDRES DIAZ CAMPOS.- R. M. No. 79982662

Datos del denunciante

Apellidos y nombres completos: EDGAR DAVID REGINO H.

Documentos de identificación (Clase y número)	Firma
C.C. No. 15.030.154 DE LORICA/ CORDOBA	[firma]

Primer testigo

Apellidos y nombres completos: ------------------

Documentos de identificación (Clase y número)	Firma
------------------	----------

Segundo testigo

Apellidos y nombres completos: ------------------

Documentos de identificación (Clase y número)	Firma
------------------	----------

Fecha de inscripción	Nombre y firma del funcionario que autoriza
Año 2004 Mes 11 Día 02	BLANCA LUCIA VALLEJO RESTREPO NOTARIA 32

Sello: NOTARIA 32 DE BOGOTA D.C. — REPUBLICA DE COLOMBIA — BLANCA LUCIA VALLEJO

ESPACIO PARA NOTAS

PADRES: ALFONSO CASTRO
MERCEDES DUQUE.

ORIGINAL PARA LA OFICINA DE REGISTRO

© Prensa S.A. NIT. 860.021.151-0

288
25

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 08-070792- -00000-0000

Fecha: 2008-07-09 16:53:38 Dep: 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 287

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION [✓] MODELO DE UTILIDAD [ ]

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Descripción de la invención [ ]
- Dibujos de ser estos pertinentes [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] 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 9/07/08

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

289
286

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO
Apoderado(a) y/o Representante de
ASTRAZENECA A.B.

REFERENCIA	Radicación No.	8 70792
	Solicitud internacional	PCT/US2006/047059
	Fecha inicio fase nacional	13/07/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	09887

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, deben legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil.

2. Debe aclarar el nombre del solicitante, por cuanto la publicación internacional difiere del petitorio presentado en fase nacional.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 01 AGO. 2008
jfernand