



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 334 494**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02739258 .8**
96 Fecha de presentación : **13.05.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1392359**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.03.2004**

54 Título: **Proteínas de unión específicas y uso de las mismas.**

30 Prioridad: **11.05.2001 US 290410 P**
28.09.2001 US 326019 P
21.12.2001 US 342258 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.03.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.03.2010

73 Titular/es:
Ludwig Institute for Cancer Research Ltd.
605 Third Avenue
New York, New York 10158, US

72 Inventor/es: **Old, Lloyd, J.;**
Johns, Terrance, Grant;
Panousis, Con;
Scott, Andrew, Mark;
Renner, Christoph;
Ritter, Gerd;
Jungbluth, Achim;
Stockert, Elisabeth;
Collins, Peter;
Cavenee, Webster, K.;
Huang, Huei-Jen;
Burgess, Anthony, Wilks y
Nice, Edouard, Collins

74 Agente: **Ungría López, Javier**

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas de unión específicas y usos de las mismas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a miembros de unión específica, concretamente anticuerpos y sus fragmentos, que se unen al receptor del factor de crecimiento epidérmico amplificado (EGFR) y al truncamiento de 2-7 EGFR del EGFR. En particular, el epítipo reconocido por los miembros de unión específica, concretamente anticuerpos y sus fragmentos, es intensificado o evidente tras la modificación post-traducciona aberrante. Estos miembros de unión específica son útiles en la diagnosis y el tratamiento del cáncer. Los miembros de unión de la presente invención también se pueden utilizar en terapia combinados con agentes quimioterapéuticos o anti-cancerosos y/o otros anticuerpos o sus fragmentos.

15 **Antecedentes de la invención**

El tratamiento de las enfermedades proliferativas, concretamente el cáncer, mediante métodos quimioterapéuticos a menudo depende de la explotación de las diferencias en las células diana en proliferación y otras células normales del organismo humano o animal. Por ejemplo, muchos agentes químicos se diseñan para ser absorbidos por el ADN que replica rápidamente de manera que el proceso de replicación del ADN y de división celular es interrumpido. Otro enfoque consiste en identificar antígenos sobre la superficie de las células tumorales u otras células anómalas que no son expresados normalmente en el tejido humano desarrollado, tales como los antígenos tumorales o los antígenos embrionarios. Tales antígenos pueden ser localizados con proteínas de unión tales como anticuerpos que pueden bloquear o neutralizar el antígeno. Además, las proteínas de unión, incluyendo los anticuerpos y sus fragmentos, pueden liberar un agente tóxico u otra sustancia que sea capaz de activar directa o indirectamente un agente tóxico en el sitio del tumor.

El EGFR es una diana atractiva para la terapia con anticuerpos dirigida a tumores debido a que es sobre-expresado en muchos tipos de tumores epiteliales (27,28). Por otra parte, la expresión de EGFR está asociada con una prognosis pobre en numerosos tipos de tumores incluyendo de estómago, de colon, de vejiga urinaria, de mama, de próstata, de endometrio, de riñón y de cerebro (p. ej., glioma). Por consiguiente, se ha informado sobre numerosos anticuerpos para EGFR en la literatura con varias evaluaciones clínicas en marcha (18, 19, 29). Los resultados de los estudios en los que se utilizan mAb para EGFR en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón de células escamosas, gliomas cerebrales y astrocitomas malignos han sido esperanzadores. La actividad antitumoral de la mayoría de los anticuerpos para EGFR es potenciada por su capacidad para bloquear la unión al ligando (30, 31). Tales anticuerpos pueden mediar su eficacia a través tanto de la modulación de la proliferación celular como de las funciones inmunitarias dependientes de los anticuerpos (p. ej., activación del complemento). El uso de estos anticuerpos, no obstante, puede estar limitado por la absorción en órganos que tienen niveles endógenos elevados de EGFR tales como el hígado y la piel (18, 19).

Una proporción significativa de tumores que contienen amplificaciones del gen EGFR (esto es, múltiples copias del gen EGFR) también expresan simultáneamente una versión truncada del receptor (13) conocido como de 2-7 EGFR, Δ EGFR, o Δ 2-7 (términos utilizados aquí indistintamente) (2). El reordenamiento observado en de 2-7 EGFR da como resultado un ARNm maduro en marco que carece de 801 nucleótidos que abarcan los exones 2-7 (6-9). La correspondiente proteína EFGR tiene una delección de 267 aminoácidos que comprende los restos 6-273 del dominio extracelular y un resto glicina novedoso en la confluencia de la fusión (9). Esta delección, junto con la inserción de un resto glicina, produce un péptido de empalme único en la interfaz de la delección (9). Se ha informado de de 2-7 EGFR (2) en numerosos tipos de tumores incluyendo glioma, mama, pulmón, ovárico y próstata (1-4). Si bien este receptor truncado no se une al ligando, posee poca actividad constitutiva y confiere una ventaja de crecimiento significativa a las células de glioma desarrolladas como xenoinjertos tumorales en ratones carentes de sistema inmunitario (10) y es capaz de transformar células NIH3T3 (11) y células MCF-7. Los mecanismos utilizados por de 2-7 EGFR en células de glioma no están completamente definidos pero se ha informado que incluyen una disminución de la apoptosis (12) y un pequeño aumento de la proliferación (12).

Como la expresión de este receptor truncado está restringida a las células tumorales, ésta representa una diana altamente específica para la terapia con anticuerpos. Por consiguiente, numerosos laboratorios han informado sobre la generación de anticuerpos tanto policlonales (14) como monoclonales (3, 15, 16) específicos para el único péptido de de 2-7 EGFR. Una serie de mAb de ratón, aislados después de la inmunización con el péptido de 2-7 único, mostraron selectividad y especificidad para el receptor truncado y eligieron como diana los xenoinjertos de 2-7 EGFR positivos desarrollados en ratones carentes de sistema inmunitario (3, 25, 32).

No obstante, un defecto potencial de los anticuerpos para de 2-7 EGFR es que solamente una proporción de tumores que muestran amplificación del gen EGFR también expresan de 2-7 EGFR (5). El porcentaje exacto de tumores que contienen de 2-7 EGFR no está completamente establecido, debido a que el uso de técnicas diferentes (esto es PCR versus inmunohistoquímica) y diferentes anticuerpos, ha producido una amplia gama de valores referidos para la frecuencia de su presencia. Los datos publicados indican que aproximadamente 25-30% de los gliomas expresan de 2-7 EGFR siendo la expresión más baja en astrocitomas anaplásicos y la más alta en glioblastoma multiforme (6,13,17). Se ha informado de que la proporción de células positivas en los gliomas que expresan de 2-7 EGFR oscila entre 37-

86% (1). Se encontró que un 27% de los carcinomas de mama y un 17% de los cánceres de pulmón eran positivos para de2-7 EGFR (1, 3, 13, 16). De este modo, cabría esperar que los anticuerpos específicos para de2-7 EGFR fueran útiles solamente en un porcentaje de tumores positivos para EGFR.

5 De este modo, si bien la evidencia existente de actividad de los anticuerpos para EGFR es esperanzadora, continúan las limitaciones observadas sobre el intervalo de aplicabilidad y eficacia reflejadas antes. Por consiguiente, sería deseable desarrollar anticuerpos y agentes similares que demuestren eficacia con una amplia gama de tumores, y es a la consecución de ese objetivo a la que está dirigida la presente invención.

10 No se debe considerar que la mención de referencias en la presente memoria represente técnica anterior de la presente invención.

15 Kuan *et al*, International Journal of Cancer (2000) 88(6): 962-969 describen un fragmento scfv que reconoce el péptido de empalme en EGFRvIII/de2-7 EGFR que está presente en células tumorales que albergan el mutante por delección y está ausente en células normales.

Compendio de la invención

20 La presente invención proporciona un anticuerpo aislado o uno de sus fragmentos activos que reconoce un epítipo EGFR que se encuentra en células tumorigénicas o hiperproliferativas o células que expresan en exceso EGFR o que expresan un mutante de EGFR, donde dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos activos (i) se une a EGFR de tipo salvaje humano unido a la célula solamente cuando EGFR es amplificado o expresado en exceso; (ii) se une a de2-7 EGFR en un epítipo distinto del péptido de empalme LEEKKGNYVVTDH y (iii) se une a un epítipo en la secuencia de restos 273-501 del EGFR de tipo salvaje humano.

25 La presente invención proporciona un miembro de unión específico aislado, concretamente un anticuerpo o uno de sus fragmentos, que reconoce un epítipo EGFR que no demuestra ninguna alteración o sustitución en la secuencia de aminoácidos con respecto al EGFR de tipo salvaje y que se encuentra en células tumorigénicas, hiperproliferativas o anormales y no es detectable en células normales o de tipo salvaje (el término “célula de tipo salvaje” según se utiliza en la presente memoria contempla una célula que expresa EGFR endógeno pero no 2-7 EGFR y el término excluye específicamente una célula que expresa en exceso el gen EGFR; el término “tipo salvaje” hace referencia a un genotipo o fenotipo u otra característica presente en una célula normal en lugar de un una célula anormal o tumorigénica). El miembro de unión específica, concretamente un anticuerpo o uno de sus fragmentos, reconoce un epítipo de EGFR que se encuentra en las células tumorigénicas, hiperproliferativas o anormales y no es detectable en células normales o de tipo salvaje, donde el epítipo es aumentado o evidenciado tras la modificación post-traducciona aberrante o la expresión aberrante. En una ilustración no limitante concreta proporcionada en la presente memoria, el epítipo EGFR es aumentado o resulta evidente en el que la modificación post-traducciona no es completa o total hasta el punto observado en la expresión normal de EGFR en las células de tipo salvaje. En un aspecto, el epítipo EGFR es aumentado o resulta evidente tras la modificación e carbohidratos inicial o simple o la glicosilación temprana, concretamente modificación con alto contenido de manosa, y es reducido o no resulta evidente en presencia de una modificación de carbohidratos compleja.

30 El miembro de unión específica, que puede ser un anticuerpo o uno de sus fragmentos, tal como uno de sus fragmentos inmunogénicos, no se une a ni reconoce células de tipo salvaje o normales que contienen un epítipo EGFR de tipo salvaje en ausencia de expresión aberrante y en presencia de una modificación post-traducciona de EGFR normal. Más concretamente, el miembro de unión específica de la invención, que puede ser un anticuerpo o uno de sus fragmentos, reconoce un epítipo EGFR que está presente en las células que expresan EGFR en exceso (p. ej., el gen EGFR es amplificado) o que expresan de2-7 EGFR, concretamente en presencia de una modificación post-traducciona aberrante, y que no es detectable en células que expresan EGFR en condiciones normales, concretamente en presencia de una modificación post-traducciona normal.

35 Los autores de la presente invención han descubierto los anticuerpos monoclonales novedosos, ilustrados en la presente memoria por el anticuerpo denominado mAb 806, que reconocen específicamente EFGR expresado aberrantemente. En particular, los anticuerpos de la presente invención reconocen un epítipo EGFR que se encuentra en células tumorigénicas, hiperproliferativas o anormales y no es detectable en células normales o de tipo salvaje, donde el epítipo es aumentado o resulta evidente tras la modificación post-traducciona aberrante. Los anticuerpos de la presente invención son ilustrados adicionalmente por los anticuerpos mAb 124 y mAb 1133 descritos en la presente memoria. Los anticuerpos novedosos de la invención también reconocen EGFR de tipo salvaje amplificado y de2-7 EGFR, pero se unen a un epítipo distinto del péptido de empalme único de la mutación de2-7 EGFR. Los anticuerpos de la presente invención reconocen específicamente el EGFR expresado aberrantemente, incluyendo EGFR amplificado o EGFR mutante (ilustrado en la presente memoria por la mutación de2-7), concretamente tras la modificación post-traducciona aberrante. Adicionalmente, mientras mAb 806 no reconoce el EGFR cuando es expresado sobre la superficie de la célula de una línea celular de glioma que expresa cantidades normales de EGFR, no se une al dominio extracelular del EGFR (sEGFR) inmovilizado sobre la superficie de placas ELISA, indicando el reconocimiento de un epítipo conformacional. MAb 806 se une a la superficie de las células A431, que tienen una amplificación del gen EGFR pero no expresan de2-7 EGFR. En gran medida, mAb 806 no se unía significativamente a tejidos normales tales como hígado y piel, que expresan niveles de EGFR de tipo salvaje (wt) endógeno que son mayores que en la mayoría de los otros tejidos normales, pero donde EGFR no es expresado o amplificado aberrantemente.

ES 2 334 494 T3

Los anticuerpos de la presente invención pueden clasificar específicamente la naturaleza de los tumores o células tumorigénicas con EGFR, tiñendo o reconociendo de otro modo aquellos tumores o células en los que se encuentra presente la expresión de EGFR aberrante, incluyendo la amplificación de EGFR y/o la mutación de EGFR, concretamente de2-7EGFR. Adicionalmente, los anticuerpos de la presente invención, ilustrados por mAb 806, demuestran una actividad anti-tumoral *in vivo* significativa frente a tumores que contienen EGFR amplificado y contra xenoinjertos de2-7 EGFR positivos.

La especificidad única de mAb 806, donde el mAb 806 se une a de2-7 EGFR y EGFR amplificado pero no al EGFR de tipo salvaje, normal proporciona usos diagnósticos y terapéuticos para identificar, caracterizar y dirigir numerosos tipos de tumores, por ejemplo, tumores de cabeza y cuello, mama, o próstata y glioma, sin los problemas asociados con la absorción en tejido normal que se pueden observar con los anticuerpos EGFR conocidos previamente.

Por consiguiente, la invención proporciona proteínas de unión específica, tales como anticuerpos, que se unen a de2-7 EGFR en un epítipo que es distinto del péptido de empalme pero que no se unen a EGFR en células normales en ausencia de amplificación del gen EGFR. Por amplificación, se quiere significar que la célula comprende múltiples copias del gen EGFR.

El epítipo reconocido por mAb 806 está localizado en la región que comprende los restos 273-501 de la secuencia de EGFR normal o de tipo salvaje madura. Por lo tanto, se proporcionan proteínas específicas, tales como anticuerpos, que se unen a de2-7 EGFR en un epítipo localizado en la región que comprende los restos 273-501 de la secuencia de EGFR. El epítipo puede ser determinado mediante cualquiera de las técnicas de mapeo epitópico convencionales conocidas por los expertos en la técnica. Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica los restos 273-501 podía ser digerida, y los fragmentos resultantes expresados en un anfitrión adecuado. La unión al anticuerpo podía ser determinada como se ha mencionado antes.

En un aspecto preferido, el anticuerpo es uno que tiene las características del anticuerpo que han identificado y caracterizado los autores de la invención, en particular que reconoce el EGFR expresado aberrantemente, como se encuentra en el EGFR amplificado y el de2-7EGFR. En un aspecto particularmente preferido el anticuerpo es el mAb 806, o uno de sus fragmentos activos. En un aspecto adicionalmente preferido el anticuerpo de la presente invención comprende las secuencias de aminoácidos de VH y VL representadas en las Figuras 14 (SEQ ID NO: 2) y Figuras 15 (SEQ ID NO: 4) respectivamente.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo capaz de competir con el anticuerpo 806, en condiciones en las que se bloquea la unión de al menos un 10% de un anticuerpo que tiene las secuencias de VH y VL del anticuerpo 806 a de2-7EGFR mediante competición con semejante anticuerpo en un análisis ELISA. En particular, se contemplan anticuerpos anti-idiotípicos y se ilustran en la presente memoria. Los anticuerpos anti-idiotípicos LMH-11, LMH-12 y LMH-13 se proporcionan en la presente memoria.

Un polipéptido aislado que consiste esencialmente en el epítipo que comprende los restos 273-501 del EGFR de tipo salvaje, normal maduro (restos 6-234 de de2-7 EGFR maduro) forma otro aspecto de la presente invención. El péptido de la invención es particularmente útil en análisis o kits de diagnóstico y terapéuticamente o profilácticamente, incluyendo en forma de vacuna contra tumores o anticancerosa. De este modo las composiciones del péptido de la presente invención incluyen composiciones farmacéuticas y composiciones inmunogénicas.

La unión de un anticuerpo a su antígeno diana está mediada por las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de sus cadenas pesadas y ligeras, siendo el papel de la CDR3 de particular importancia. Por consiguiente, los miembros de unión específica basados en las regiones CDR3 de la cadena pesada o ligera, y preferiblemente ambas, de mAb806 serán miembros de unión específica útiles para la terapia *in vivo*. Las CDR del anticuerpo mAb 806 se muestran en las Figuras 16 y 17.

Por consiguiente, las proteínas de unión específica tales como los anticuerpos que están basados en el anticuerpo mAb 806 identificado, particularmente las regiones CDR 3, serán útiles para elegir como diana los tumores con EGFR amplificado independientemente de su estado de2-7 EGFR. Puesto que el mAb 806 no se une significativamente al receptor de tipo salvaje. normal, no habría una absorción significativa en tejido normal, una limitación de los anticuerpos contra EGFR que están siendo desarrollados en la actualidad (18, 19). En los dibujos adjuntos, se muestra en la Figura 14 la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 1) y la traducción de la misma (SEQ ID NO: 2) del gen 806 VH. El gen VL del anticuerpo 806 se muestra en la Figura 15 como secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 3) y secuencia de aminoácidos pronosticada (SEQ ID NO: 4). En las Figuras 16 y 17, que representan las secuencias polipeptídicas de VH y VL de mAb 806, las CDR se indican en recuadros.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un miembro de unión específica aislado capaz de unirse aun antígeno, donde dicho miembro de unión específica comprende un dominio de unión al polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos esencialmente presentada como los restos 115-123 del SEQ ID NO: 2. La invención proporciona adicionalmente dicho miembro de unión específica aislado que comprende adicionalmente uno o ambos dominios de unión al polipéptido esencialmente presentada como los restos 44-54 y 68-83 del SEQ ID NO: 2, preferiblemente ambos. Un ejemplo de semejante realización es la secuencia expuesta esencialmente en el SEQ ID NO: 2. En una realización preferida, los dominios de unión son portados por un marco del anticuerpo humano.

ES 2 334 494 T3

En otro aspecto, la invención proporciona un miembro de unión específico aislado capaz de unirse a un antígeno tumoral, donde dicho miembro de unión específica comprende un dominio de unión al polipéptido que comprende una secuencia de la cadena pesada que comprende al menos la secuencia CDR3 del SEQ ID NO: 2, junto con una cadena ligera que comprende las CDR cuyas secuencias de aminoácidos son esencialmente las encontradas en el SEQ ID NO: 4. Un ejemplo de semejante realización es la secuencia que se muestra esencialmente en el SEQ ID NO: 4. En una realización preferida, las CDR son portadas por un marco de un anticuerpo humano.

En aspectos adicionales, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un miembro de unión específico como se ha definido antes, y los métodos para la preparación de los miembros de unión específicos de la invención que comprenden expresar dichos ácidos nucleicos en condiciones que ocasionen la expresión de dicho miembro de unión, y recuperar el miembro de unión.

Otro aspecto adicional más de la invención son las composiciones de tales proteínas de unión con proteínas de unión adicionales, tales como las proteínas de unión que se unen a EGFR, preferiblemente inhibiendo la unión del ligando a esta. Tales composiciones pueden ser cócteles de “una aplicación”, kits, etcétera, formulados preferiblemente para facilitar la administración.

Los miembros de unión específica de acuerdo con la invención se pueden utilizar en un método de tratamiento o diagnóstico del organismo humano o animal, tal como un método de tratamiento de un tumor en un paciente humano que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de un miembro de unión específico de la invención.

La presente invención también se refiere a una molécula de ADN recombinante o un gen clonado, o una de sus variantes degeneradas, que codifica un anticuerpo de la presente invención; preferiblemente una molécula de ácido nucleico, en particular una molécula de ADN recombinante o gen clonado, que codifica la VH del anticuerpo que tiene una secuencia de nucleótidos o es complementaria a una secuencia de ADN mostrada en la Figura 14 (SEQ ID NO: 1). En otra realización, la presente invención también se refiere a una molécula de ADN recombinante o gen clonado, o una de sus variantes degeneradas, preferiblemente una molécula de ácido nucleico, en particular una molécula de ADN recombinante o gen clonado, que codifica la VL del anticuerpo que tiene una secuencia de nucleótidos o es complementaria a una secuencia de ADN mostrada en la Figura 15 (SEQ ID NO: 3).

La presente invención también incluye polipéptidos o anticuerpos que tienen las actividades indicadas en la presente memoria, y que presentan las secuencias de aminoácidos mostradas y descritas antes y en las Figuras 14 y 15 de la presente y seleccionadas entre los SEQ ID NO: 2 y 4.

En una realización adicional de la invención, la secuencia de ADN completa de la molécula de ADN recombinante o gen clonado proporcionado en la presente memoria puede estar conectado operativamente a una secuencia de control de la expresión que puede ser introducida en un anfitrión apropiado. La invención se extiende por consiguiente a anfitriones unicelulares transformados con el gen clonado o la molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN que codifica la VH y/o VL presentes, o sus porciones, del anticuerpo, y más concretamente, la VH y/o VL expuestas antes y en los SEQ ID NO: 1 y 3.

La presente invención contempla naturalmente diversos medios para la preparación de los anticuerpos y sus fragmentos activos, incluyendo como se ilustra en la presente memoria las técnicas recombinantes conocidas, y por consiguiente se pretende que la invención abarque tales preparaciones de anticuerpo sintético o quimérico dentro de su alcance. El aislamiento del ADNc y las secuencias de aminoácidos descritas en la presente memoria facilita la reproducción del anticuerpo de la presente invención mediante tales técnicas recombinantes, y por consiguiente, la invención se extiende a los vectores de expresión preparados a partir de las secuencias de ADN descritas para su expresión en sistemas anfitriones mediante técnicas de ADN recombinante, y a los anfitriones transformados resultantes.

La presente invención proporciona fármacos u otras entidades, incluyendo anticuerpos tales como anticuerpos anti-idiotípicos, que son capaces de unirse al anticuerpo modulando, inhibiendo o potenciando de ese modo la actividad del anticuerpo. Así, se proporcionan y se ilustran en la presente memoria anticuerpos anti-idiotípicos para mAb806. Tales anticuerpos anti-idiotípicos serían útiles en el desarrollo de fármacos que se unirían específicamente a anticuerpos tales como mAb806 o su epítipo o que potenciarían su actividad.

La utilidad diagnóstica de la presente invención se extiende al uso de los anticuerpos de la presente invención en análisis para caracterizar tumores o muestras celulares o para escrutar tumores o cáncer, incluyendo análisis diagnósticos *in vitro* e *in vivo*.

En un inmunoanálisis, se puede preparar una cantidad de control de los anticuerpos, o similares y se pueden marcar con una enzima, un compañero de unión específico y/o un elemento radiactivo, y después se pueden introducir en una muestra celular. Una vez que el material marcado o su compañero o sus compañeros de unión han tenido la oportunidad de reaccionar con los sitios de la muestra, se puede examinar la masa resultante mediante técnicas conocidas, que pueden variar con la naturaleza de la marca unida.

Los miembros de unión específica de la invención pueden llevar una marca detectable o funcional. Los miembros de unión específica pueden llevar marcas radiactivas, tales como los isótopos H³, C¹⁴, P³², S³⁵, Cl³⁶, Cr⁵¹, Co⁵⁷, Co⁵⁸,

ES 2 334 494 T3

5 Fe⁵⁹, Y⁹⁰, I¹²¹, I¹²⁴, I¹²⁵, I¹³¹, In¹¹¹, At²¹¹, Au¹⁹⁸, Cu⁶⁷, Ac²²⁵, Bi²¹³, Tc⁹⁹ y Re¹⁸⁶. Cuando se utilizan marcas radiactivas, se pueden emplear procedimientos de recuento asequibles en la actualidad conocidos para identificar y cuantificar los miembros de unión específica. En el caso en el que la marca es una enzima, la detección se puede completar mediante cualquiera de las técnicas colorimétricas, espectrofotométricas, fluoroespectrofotométricas, amperométricas o gasométricas actualmente utilizadas conocidas en la técnica.

10 Los miembros de unión específica radiomarcados, particularmente los anticuerpos y sus fragmentos, son útiles en técnicas diagnósticas *in vitro* y en técnicas de formación de imágenes radiológicas *in vivo*. En un aspecto adicional de la invención, los miembros de unión específica radiomarcados, concretamente los y sus fragmentos, particularmente los productos radioinmunoconjugados, son útiles en radioinmunoterapia, particularmente como anticuerpos radio-
15 marcados para la terapia contra el cáncer. En un aspecto adicional, los miembros de unión específica radiomarcados particularmente los anticuerpos y sus fragmentos, son útiles en las técnicas de cirugía radioinmuno-guía, donde pueden identificar e indicar la presencia y/o localización de células cancerosas, células precancerosas, células tumorales, y células hiperproliferativas, antes de, durante o después de la cirugía para eliminar tales células.

20 Los productos inmunoconjugados o las proteínas de fusión con anticuerpos de la presente invención, donde los miembros de unión específica, particularmente anticuerpos y sus fragmentos, de la presente invención están conjugados o anclados a otras moléculas o agentes incluyen adicionalmente, pero no están limitados a miembros de unión conjugados con un agente de ablación química, toxina, inmunomodulador, citoquina, agente citotóxico, agente quimioterapéutico o fármaco.

25 La presente invención incluye un sistema de análisis que puede ser preparado en forma de un kit de ensayo para el análisis cuantitativo del grado de presencia, por ejemplo de EGFR amplificado o de 2-7EGFR. El sistema o kit de ensayo puede comprender un componente marcado preparado mediante una de las técnicas radiactivas y/o enzimáticas comentadas en la presente memoria, acoplamiento de una marca al anticuerpo, y uno o más de reactivos inmunológicos adicionales, al menos uno de los cuales es un componente libre o inmovilizado que va a ser determinado o su compañero o compañeros de fusión.

30 En una realización adicional, la presente invención hace referencia a ciertos métodos terapéuticos que estarían basados en la actividad del miembro de unión, anticuerpo, o sus fragmentos activos, o en agentes u otros fármacos que se ha determinado que poseen la misma actividad. Un primer método terapéutico está asociado con la prevención o tratamiento del cáncer, incluyendo, pero no limitado al de cabeza y cuello, mama, próstata y glioma.

35 En particular, los miembros de unión y anticuerpos de la presente invención, y en una realización concreta el anticuerpo 806 cuyas secuencias están presentes en los SEQ ID NO: 2 y 4 en la presente memoria, o sus fragmentos activos, y los anticuerpos quiméricos (bienespecíficos) o sintéticos derivados de ellos pueden ser preparados en composiciones farmacéuticas, incluyendo un vehículo, portador o diluyente adecuado, para la administración en los casos en los que la terapia es apropiada, por ejemplo para tratar el cáncer. Tales composiciones farmacéuticas también pueden incluir métodos de modulación de la vida media de los miembros de unión, anticuerpos o fragmentos mediante métodos conocidos en la técnica tal como la pegilación. Tales composiciones farmacéuticas pueden comprender anticuerpos o agentes terapéuticos adicionales.

45 De este modo, una composición de la presente invención puede ser administrada sola o combinada con otros tratamientos, sustancias terapéuticas o agentes, ya sea simultáneamente o sucesivamente dependiendo de la condición que se vaya a tratar. Además, la presente invención contempla e incluye composiciones que comprenden el miembro de unión, concretamente anticuerpo o su fragmento, descrito en la presente memoria y otros agentes o sustancias terapéuticas tales como agentes anti-cancerosos o terapéuticos, agentes o anticuerpos anti-EGFR, o moduladores inmunitarios. Más generalmente estos agentes anticancerosos pueden ser inhibidores de tirosina quinasa o inhibidores de la cascada de fosforilación, moduladores post-traduccionales, inhibidores del crecimiento o la división celular (p. ej. anti-mitóticos), inhibidores de PDGFR o inhibidores de la transducción de la señal. Otros tratamientos o agentes terapéuticos pueden incluir la administración de dosis adecuadas de fármacos de fármacos que alivian el dolor tales como los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (p. ej. aspirina, paracetamol, ibuprofeno o cetoprofeno) u opiáceos tales como morfina, o anti-eméticos. De este modo, estos agentes pueden ser agentes específicos anti-EGFR, tales como AG1478, o pueden ser agentes anti-cancerosos y anti-neoplásicos más generales, incluyendo los ejemplos no limitantes doxorubicina, carboplatino y cisplatino. Además, la composición puede ser administrada con moduladores inmunitarios, tales como interleuquinas, factor de necrosis tumoral (TNF) u otros factores de crecimiento, citoquinas u hormonas tales como dexametasona que estimula la respuesta inmunitaria y la reducción o eliminación de las células cancerosas o tumores. La composición también puede ser administrada con, o puede incluir combinaciones con otros anticuerpos anti-EGFR, incluyendo pero no limitados a los anticuerpos anti-EGFR anticuerpos 528; 225; SC-03; 108 (ATCC HB9764) Patente de los Estados Unidos Núm. 6.217.866; 14E1 (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.942.602); DH8.3; L8A4; Y10; HuMAX-EGFr (Genmab/Medarex); ICR62; y ABX-EGF (Abgenix).

65 La presente invención también incluye miembros de unión, incluyendo anticuerpos y sus fragmentos, que se unen covalentemente o se asocian de otro modo con otras moléculas o agentes. Estas otras moléculas o agentes incluyen, pero no están limitados a, moléculas (incluyendo anticuerpos o fragmentos de anticuerpos) con características de reconocimiento distintas, toxinas, ligandos, y agentes quimioterapéuticos.

Otros objetos y ventajas se harán evidentes para los expertos en la técnica a partir de una revisión de la consiguiente descripción detallada, que continúa con la referencia a los siguientes dibujos ilustrativos, y las reivindicaciones adjuntas.

5 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 presenta los resultados del análisis de citometría de flujo de líneas celulares de glioma. Se tiñeron células U87MG (histogramas gris claro) y U87MG.Δ2-7 (histogramas gris oscuro) con anticuerpo IgG2b irrelevante (histogramas vacíos), DJ8.3 (específico para de2-7 EGFR), MAb 806 o 528 (se une tanto al tipo salvaje como a de2-7 EGFR) según se indique.

Las Figuras 2A.C presentan los resultados del ELISA de los anticuerpos MAb 806, DH8.3 y 528. (A) Unión de concentraciones crecientes de anticuerpo MAb 806 (▲) DH8.3 (●) o 528 (■) a placas de ELISA recubiertas con sEGFR. (B) Inhibición de la unión de MAb 806 y 528 a placas de ELISA recubiertas con sEGFR por concentraciones crecientes de sEGFR en solución. (C) La unión de concentraciones crecientes de DH8.3 al péptido de empalme de2-7 ilustra las curvas de unión para los anticuerpos mAb 806 y 528 a sEGFR de tipo salvaje inmovilizado.

Las Figuras 2D y 2E presentan gráficamente los resultados de los estudios de unión BIAcore utilizando péptido biotinilado C-terminal e incluyendo un anticuerpo monoclonal de la invención, junto con otros anticuerpos conocidos, entre ellos el anticuerpo L8A4 que reconoce el péptido de empalme del de2-7 EGFR mutante, y controles.

La Figura 3 describe la internalización del anticuerpo MAb 806 y DH8.3. Se pre-incubaron células U87MG.Δ2-7 con MAb 806 (▲) o DH8.3 (●) a 4°C, se transfirieron a 37°C y se determinó la internalización mediante FACS. Los datos representan la internalización media en cada momento puntual \pm DT de 3 (DH8.3) o 4 (MAb 806) experimentos separados.

Las Figuras 4A y 4B ilustran la biodistribución (% DI/g tumor) de (a) MAb 806- I^{125} y (b) DH8.3 I^{131} radiomarcados en ratones carentes de sistema inmunitario que portan xenoinjertos U87MG y U87MG.Δ2-7. Cada punto representa la media de 5 ratones \pm DT excepto para 1 hr donde $n = 4$.

Las Figuras 5A y 5B ilustran la biodistribución de los anticuerpos MAb 806 I^{125} (barra vacía) y DH8.3 I^{131} (barra opaca) radiomarcados expresada como las razones (a) tumor:sangre o (b) tumor:hígado en ratones carentes de sistema inmunitario que portaban xenoinjertos U87MG.Δ2-7. Cada barra representa la media de 5 ratones \pm DT excepto para 1 hr donde $n = 4$.

La Figura 6 ilustra el análisis de citometría de flujo de líneas celulares que contienen la amplificación del gen EGFR. Las células A431 fueron teñidas con MAb 806, DH8.3 o 528 (histogramas en negro) y comparadas con el anticuerpo IgG2b irrelevante (histograma vacío).

Las Figuras 7A y 7B ilustran la biodistribución (% DI/g tumor) de (a) MAb 806- I^{125} y (b) 528- I^{131} radiomarcados en ratones carentes de sistema inmunitario que portaban xenoinjertos U87MG.Δ2-7 y A431.

Las Figuras 8A - 8D ilustran la biodistribución de los anticuerpos MAb 806- I^{125} (barra vacía) y 528- I^{131} (barra opaca) y anticuerpos expresada en forma de razones (a,b) tumor:sangre o (c,d) tumor:hígado en ratones carentes de sistema inmunitario que portaban (a,c) xenoinjertos U87MGΔ2-7 y (b,d) xenoinjertos A431.

La Figura 9 ilustra el efecto anti-tumoral de mAb 806 sobre las velocidades de crecimiento de xenoinjerto A) U87MG y B) U87MG.Δ2-7 en un modelo preventivo. Se inyectaron s.c. 3×10^6 células U87MG o U87MG.Δ2-7 en ambos flancos de ratones carentes de sistema inmunitario BALB/c de 4-6 semanas de edad, ($n=5$) el día 0. Se inyectaron a los ratones i.p. o bien 1 mg de mAb 806 (●); 0,1 mg de mAb 806 (▲); o bien vehículo (○) empezando un día antes de la inoculación de las células tumorales. Se les administraron inyecciones tres veces por semana durante dos semanas según se indica mediante flechas. Los datos se expresan como el volumen medio del tumor \pm D.T.

La Figura 10 ilustra el efecto anti-tumoral de mAb 806 sobre xenoinjertos A) U87MG, B) U87MG.Δ2-7 y C) U87MG.wtEGFR en un modelo establecido. Se inyectaron s.c. 3×10^6 células U87MG, U87MG.Δ2-7, o U87MG.wtEGFR, en ambos flancos de ratones BALB/c carentes de sistema inmunitario de 4-6 semanas de edad, ($n=5$). Se inyectaron i.p. a los ratones dosis de 1 mg de mAb 806 (●); dosis de 0,1 mg de mAb 806 (▲); o vehículo (○) empezando cuando los tumores habían alcanzado un volumen medio de tumor de $65 - 80 \text{ mm}^3$. Las inyecciones se administraron tres veces por semana durante dos semanas según se indica mediante flechas. Los datos se expresan como el volumen medio del tumor \pm D.T.

La Figura 11 ilustra el efecto anti-tumoral de mAb 806 sobre xenoinjertos A431 en modelos A) preventivos y B) establecidos. Se inyectaron s.c. 3×10^6 células A431 en ambos flancos de ratones BALB/c carentes de sistema inmunitario de 4-6 semanas de edad ($n=5$). Se inyectaron a los ratones i.p. o bien dosis de 1 mg de mAb 806 (●); o bien vehículo (○), empezando un día antes de la inoculación de las células tumorales en el modelo preventivo, o cuando los tumores habían alcanzado un volumen medio de tumor de 200 mm^3 . Las inyecciones se administraron tres veces por semana durante dos semanas como se indica mediante flechas. Los datos se expresan como el volumen medio del tumor \pm D.T.

ES 2 334 494 T3

La Figura 12 ilustra el efecto anti-tumoral del tratamiento con mAb 806 combinado con el tratamiento con xenoinjertos AG1478 sobre xenoinjertos A431 en un modelo preventivo. Los datos se expresan como el volumen medio del tumor \pm D.T.

5 La Figura 13 describe la unión del anticuerpo 806 a células A431 en presencia de concentraciones crecientes de AG1478 (0,5 μ M y 5 μ M).

La Figura 14 ilustra la secuencia de ácido nucleico y su traducción a aminoácidos del gen 806 VH (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, respectivamente).

10

La Figura 15 ilustra la secuencia de ácido nucleico y su traducción a aminoácidos del gen 806 VL (SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, respectivamente).

15

La Figura 16 muestra la secuencia de VH numerada de acuerdo con Kabat, con las CDR en recuadros. Los restos clave de VH son el 24, 37, 48, 67 y 78.

La Figura 17 muestra la secuencia de VL numerada de acuerdo con Kabat, con las CDR en recuadros. Los restos clave de VL son el 36, 46, 57 y 71.

20

La Figura 18A - 18D muestra los resultados de estudios *in vivo* diseñados para determinar el efecto terapéutico de la terapia con anticuerpos combinados, particularmente los anticuerpos mAb806 y 528. Los ratones recibieron inoculaciones de U87MG.D2-7 (A y B), U87MG.DK (C), o células A431 (D).

25

Figura 19 A-D Análisis de internalización mediante microscopía electrónica. Las células U87MG. Δ 2-7 fueron preincubadas con MAb 806 o DH8.3 seguido de anti-IgG de ratón conjugado con oro a 4°C, transferidas a 37°C y la internalización fue examinada en diferentes momentos mediante microscopía electrónica. (A) localización del anticuerpo DH8.3 en una fosita recubierta (flecha) después de 5 min; (B) internalización de MAb 806 mediante macropinocitosis (flecha) después de 2 min; (C) localización de DH8.3 en lisosomas (flecha) después de 20 min; (D) localización de MAb 806 en lisosomas (flecha) después de 30 min. El aumento original para todas las imágenes es X30.000.

30

Figura 20 Autorradiografía de una sección de xenoinjerto U87MG. Δ 2-7 recogida 8 hr después de la inyección de MAb 806- I^{125} .

35

Figura 21 Análisis de citometría de flujo de líneas celulares que contienen una amplificación del gen EGFR. Se tiñeron células HN5 y MDA-468 con un anticuerpo IgG2b irrelevante (histograma vacío con línea discontinua), MAb 806 (histograma en negro) o 528 (histograma vacío con líneas cerradas). El anticuerpo DH8.3 era completamente negativo en ambas líneas celulares (datos no mostrados).

40

Figura 22 Inmunoprecipitación de EGFR a partir de líneas celulares. El EGFR fue inmunoprecipitado a partir de células U87MG. Δ 2-7 marcadas con S^{35} o células A431 con MAb 806, anticuerpo sc-03 o un control de isotipo IgG2b. Las flechas en el lateral indican la posición de Δ 2-7 y wt EGFR. Se obtuvieron patrones de bandas idénticos en 3 experimentos independientes.

45

Figura 23 Autorradiografía de una sección de xenoinjerto de A431 recogida 24 hr después de la inyección de MAb 806- I^{125} , se indican las zonas de localización en tejido viable (flechas).

50

Figura 24 A y B, aumento de la supervivencia ratones carentes de sistema inmunitario que portan xenoinjertos intracraneales U87 MG. Δ EGFR (A) y LN-Z308. Δ EGFR (B) con tratamiento con mAb 806 sistémico. Las células U87 MG. Δ EGFR (1×10^5) o LN-Z308. Δ EGFR (5×10^5) fueron implantadas en cerebros de ratones carentes de sistema inmunitario, y los animales se trataron con mAb 806, PBS, o isotipo IgG desde los días 0 a 14 después de la implantación. C y D, inhibición del crecimiento de tumores intracraneales por tratamiento con mAb 806. Los ratones carentes de sistema inmunitario (cinco por grupo), tratados con mAb 806 o el control de isotipo IgG, fueron sacrificados el día 9 para U87 MG. Δ EGFR (C) y el día 15 para LN-Z308. Δ EGFR (D), y sus cerebros fueron recogidos, fijados, y seccionados. Los datos se calcularon tomando el volumen de control del tumor como el 100%. Los valores son la media \pm DT. ***, $P < 0,001$; control *versus* mAb 806. Puntas de flecha, tejido tumoral. E, aumento de la supervivencia de ratones carentes de sistema inmunitario que portan xenoinjertos intracraneales U87 MG. Δ EGFR con tratamiento con mAb 806 intratumoral. Se implantaron células U87 MG. Δ EGFR como se ha descrito. Se inyectaron 10 mg de mAb 806 o control de isotipo IgG en un volumen de 5 μ l en el tumor-sitio de inyección en días alternos empezando el día 1 durante cinco veces.

55

60

Figura 25 mAb 806 prolonga la supervivencia de los ratones con tumores cerebrales U87 MG.wtEGFR pero no con tumores cerebrales U87 MG.DK. o U87 MG. Se implantaron células (5×10^5) U87 MG (A), U87 MG.DK (B), o U87 MG.wtEGFR (C) en cerebros de ratones carentes de sistema inmunitario, y se trataron los animales con mAb 806 desde el día 0 al 14 después del implante seguido de observación una vez interrumpida la terapia.

65

Figura 26 A, análisis FACS de la reactividad de mAb 806 con líneas de células U87 MG. Se tiñeron células U87 MG, U87 MG. Δ EGFR, U87 MG. DK, y U87 MG.wtEGFR con mAbs anti-EGFR 528, EGFR.1, y anticuerpo anti- Δ EGFR, mAb 806. El anticuerpo monoclonal EGFR.1 reconocía exclusivamente wtEGFR y el anticuerpo monoclonal

528 reaccionaba tanto con wtEGFR como con Δ EGFR, mAb 806 reaccionaba intensamente con U87 MG. Δ EGFR y U87 MG. DK y débilmente con U87 MG.wtEGFR *Barras en la abscisa*, tinción máxima de células en ausencia de anticuerpo primario. Los resultados se reprodujeron en tres experimentos independientes. B, inmunoprecipitación con mAb 806 de formas de EGFR. El mutante y el wtEGFR se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-EGFR, 528, o EGFR.1, o anticuerpo anti- Δ EGFR, mAb 806, de células (*Calle 1*) U87 MG, (*Calle 2*) U87 Δ .EGFR, (*Calle 3*) U87 MG. DK, y (*Calle 4*) U87 MG.wtEGFR y después se detectaron mediante transferencia Western con anticuerpo anti-pan EGFR, C13.

Figura 27 el tratamiento con MAb 806 conduce a una disminución del crecimiento y vasculogénesis y a un incremento en la apoptosis y acumulación de macrófagos en tumores U87 MG. Δ EGFR. Las secciones de los tumores se tiñeron para Ki-67. El índice de proliferación celular se valuó mediante el porcentaje de células totales que eran positivas para Ki-67 de cuatro campos de alta potencia seleccionados al azar (X400) en tumores intracraneales de cuatro ratones de cada grupo. Los datos son la media \pm DT. Las células apoptóticas se detectaron mediante análisis TUNEL. El índice apoptótico se evaluó mediante la razón de células TUNBL-positivas:número total de células de cuatro campos de alta potencia seleccionados al azar (X400) en tumores intracraneales de cuatro ratones de cada grupo. Los datos son la media \pm DT. las secciones de tumor se inmunotiñeron con anticuerpo anti-CD31. Se analizaron las MVA mediante análisis de imágenes por ordenador de cuatro campos seleccionados al azar (X200) de tumores intracraneales de cuatro ratones de cada grupo. Infiltrados peritumorales de macrófagos en tumores U87MG. Δ EGFR tratados con mAb 806. Las secciones de tumor se tiñeron con anticuerpo anti-F4/80.

Figura 28 El tratamiento sistémico con mAb 806 disminuye la fosforilación de Δ EGFR y la expresión de Bcl-X_L en tumores cerebrales U87 MG. Δ EGFR. Los tumores U87 MG. Δ EGFR fueron extirpados el día 9 de tratamiento con mAb 806, congelados inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C antes de la preparación del producto lisado tumoral. A, análisis de transferencia Western de la expresión y el grado de autofosforilación de Δ EGFR. Se sometieron 30 g de productos lisados tumorales a geles de SDS-poliacrilamida, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, y se sondearon con mAb antifosfotirosina, después se separaron y se volvieron a sondear con anticuerpo anti-EGFR, C13. B, transferencia Western de Hcl-X_L utilizando los mismos productos lisados tumorales que en A. Se sondearon las membranas con anticuerpo policlonal anti Bcl-X humano. *Calles 1 y 2*, tumores cerebrales U87 MG. Δ EGFR tratados con control de isotipo; *Calles 3 y 4*, tumores cerebrales U87 MG. Δ EGFR tratados con mAb 806.

Figura 29 Análisis citométrico de flujo de líneas celulares de glioma U87 MG parentales y transfectadas. Las células se tiñeron con anticuerpo IgG2b irrelevante (*histogramas vacíos*) o anticuerpo 528 o mAb 806 (*histogramas opacos*) según se indica.

Figura 30 Inmunoprecipitación de EGFR a partir de líneas celulares. Se inmunoprecipitó EGFR a partir de células U87 MG.wtEGFR, U87 MG. Δ 2-7, y A431 marcadas con S³⁵ con mAb806 (806), anticuerpo sc-03 (c-terminal), o un control de isotipo IgG2b (con). *Flechas*, posición de de2-7 y wt EGFR.

Figura 31 Secciones en parafina teñidas con H&E representativas de xenoinjertos U87 MG.2-7 y U87MG.wtEGFR. Los xenoinjertos U87 MG. Δ 2-7 (recogido 24 días después de la inoculación del tumor) y U87 MG.wtEGFR (recogido 24 días después de la inoculación del tumor) se extirparon de los ratones como se describe en la Fig. 10 anterior, y se tiñeron con H&E. Los xenoinjertos U87 MG. Δ 2-7 tratado con vehículo (recogido 18 días después de la inoculación del tumor) y U87 MG.wtEGFR (recogido 37 días después de la inoculación del tumor) mostraron muy pocas zonas de necrosis (*panel izquierdo*), mientras se observó una necrosis extensa (*flechas*) tanto en xenoinjertos U87 MG. Δ 2-7 como U87 MG.wtEGFR tratados con mAb 806 (*panel derecho*).

Figura 32 Análisis inmunohistoquímico de la expresión de EGFR en secciones congeladas derivadas de xenoinjertos U87 MG, U87 MG. Δ 2-7, y U87 MG.wtEGFR. Se recogieron secciones en los momentos descritos en la Fig. 31 anterior. Se inmunotiñeron secciones de xenoinjerto con el anticuerpo 528 (*panel izquierdo*) y mAb 806 (*panel derecho*). No se observó una disminución de la inmunorreactividad para wt EGFR, EGFR amplificado, o de2-7 EGFR en los xenoinjertos tratados con mAb 806. Coincidiendo con los datos *in vitro*, los xenoinjertos U87 MG parentales fueron positivos para el anticuerpo 528 pero fueron negativos para la tinción con mAb 806.

Figura 33. Representación esquemática de los constructos de expresión bicistrónicos generados. La transcripción de las cadenas del anticuerpo quimérico se inicia mediante el promotor del Factor de Elongación-1 y se termina mediante una secuencia de terminación artificial fuerte. Se introdujeron secuencias IRES entre las regiones codificantes de la cadena ligera y NeoR y la cadena pesada y el gen dhfr gene.

Figura 34. El análisis de la biodistribución de ch806 radiomarcado con A) I¹²⁵ o B) In¹¹¹ se realizó en ratones BALB/c carentes de sistema inmunitario que portaban tumores por xenoinjerto U87MG-de2-7. Se inyectaron a los ratones 5 μ g de anticuerpo radiomarcado y en grupos de 4 ratones por momento puntual, se sacrificaron a las 8, 28, 48 o 74 horas. Se recogieron los órganos, se pesaron y se midió la radiactividad en un contador gamma.

Figura 35. Describe (A) el % DI del tejido tumoral por gramo y (B) la razón de tumor con respecto a sangre. El anticuerpo con Indio-111 muestra aproximadamente 30% DI/gramo de tejido y una razón tumor con respecto a tejido de 4,0.

ES 2 334 494 T3

Figura 36 describe la eficacia terapéutica del anticuerpo quimérico ch806 en un modelo de tumor establecido. Se inocularon 3×10^6 células U87MG. Δ 2-7 en 100 μ l de PBS s.c en ambos flancos de ratones hembra carentes de sistema inmunitario de 4-6 semanas de edad. El mAb806 se incluyó como control positivo. El tratamiento se inició cuando los tumores habían alcanzado un volumen medio de 50 mm³ y consistió en 1 mg de ch806 o mAb806 administrado i.p. durante un total de 5 inyecciones los días indicados. Los datos se expresaron como el volumen medio del tumor +/- D.T. para cada grupo de tratamiento.

Figura 37. Actividad CDC sobre la Diana A) células U87MG.de2-7 y B) A431 para los anticuerpos IgG1 quiméricos anti-EGFR ch806 y de control cG250. Se presentan el porcentaje de citotoxicidad media (*barras*; \pm DT) de determinaciones por triplicado.

Figura 38. ADCC sobre células dianas A) U87MG.de2-7 y B) A431 a una razón Efector:Célula diana de 50:1 mediado por ch806 y control de isotipo cG250 (0-10 μ g/ml). Los resultados se expresan como el porcentaje de citotoxicidad media (*barras*; \pm DT) de determinaciones por triplicado.

Figura 39. ADCC mediada por 1 μ g/ml de mAb 806 parental y ch806 sobre células U87MG.de2-7 diana a lo largo de un intervalo de razones de Efector:Diana. Se presenta la media (*barras*; \pm DT) de determinaciones por triplicado.

Figura 40. Se seleccionaron inicialmente veinticinco hibridomas productores de anticuerpos que se unían a ch806 pero no la huIgG. Después siguieron cuatro de estos hibridomas anti-ch806 con elevada afinidad de unión (clones 3E3, 5B8, 9D6 y 4D8) para la expansión clonal a partir de células individuales mediante dilución limitante y se denominaron Ludwig Institute for Cancer Research Melbourne Hybridome (LMH) -11, -12, -13 y -14, respectivamente. Además, también se clonaron dos hibridomas que producían mAbs específicos para huIgG y se caracterizaron adicionalmente: clones 2C10 (LMH-15) y 2B8 (LMH-16).

Figura 41. Después de la expansión clonal, se examinaron los sobrenadantes de cultivo de hibridoma por triplicado mediante ELISA en cuanto a la capacidad para neutralizar la unión al antígeno de ch806 o mAb 806 con sEGFR621. Los resultados medios (\pm DT) demostraron la actividad antagónica de los mAb anti-idiotipo LMH-11, -12, -13 y -14 con el bloqueo en solución de la unión de ch806 y mAb 806 murino a placas recubiertas con sEGFR (LMH-14 no mostrado).

Figura 42. Se recubrieron placas de microtitulación con 10 μ g/ml de A) LMH-11, B) LMH-12 y C) LMH-13 purificados. Los tres clones purificados se compararon en cuanto a su capacidad para capturar ch806 o mAb 806 en suero o FCS/Medio al 1% y después se detectaron ch806 o mAb806 unidos. Se incluyeron los anticuerpos de control de isotipo hu3S193 y m3S193 en suero y FCS/Medio al 1% además de los controles para un producto conjugado secundario avidina-HRP y sustrato ABTS. Los resultados se presentan como la media (\pm DT) de muestras por triplicado utilizando LMH-12 biotinilado (10 μ g/ml) para la detección e indican que el LMH-12 utilizado para la captura y detección tenía la máxima sensibilidad para ch806 en suero (3 ng/ml) con una unión de fondo insignificante.

Figura 43. Validación de las condiciones de ELISA farmacocinético óptimo utilizando 1 μ g/ml de LMH-12 anti-idiotipo y 1 μ g/ml de LMH-12 biotinilado para la captura y detección, respectivamente. Se realizaron tres ELISA separados por cuadruplicado para medir ch806 en suero de donante (●) de tres donantes sanos o BSA/medio al 1% (■) con control de isotipo hu3S193 en suero (▲) o BSA/medio al 1% (▼). También se incluyeron los controles para producto conjugado secundario avidina-HRP (◆) y sustrato ABTS (hexagonal) solo con cada ELISA. Los resultados medios (\pm DT) demuestran curvas de unión altamente reproducibles para medir ch806 (2 μ g/ml - 1,6 ng/ml) en sueros con un límite de detección de 3 ng/ml. (n=12; 1-100 ng/ml, Coeficiente de Variación < 25%; 100 ng/ml- 5 μ g/ml, Coeficiente de Variación < 15%). No era evidente ninguna unión de fondo con ninguno de los tres sueros sometidos a ensayo y se observó una unión insignificante con el control de isotipo hu3S193.

La Figura 44 describe una inmunotransferencia de sEGFR recombinante expresado en células CHO, transferido con mAb806. Se trató sEGFR recombinante con PNGasaF para separar la glicosilación unida a N (desglicosilada), o sin tratar (no tratada), la proteína se hizo correr sobre SDS-PAGE, se transfirió a la membrana y se inmunotransfirió con mAb 806.

La Figura 45 describe la inmunoprecipitación de EGFR a partir de líneas celulares marcadas con S³⁵ (U87MG Δ 2-7, U87MG-wtEGFR, y A431) con diferentes anticuerpos (anticuerpos SC-03, 806 y 528).

La Figura 46 describe la inmunoprecipitación de EGFR a partir de diferentes células (A431 y U87MG Δ 2-7) en diferentes momentos puntuales (tiempo 0 a 240 minutos) después del marcaje por pulsos con metionina/cisteína S³⁵. Se utilizan anticuerpos 528 y 806 para la inmunoprecipitación.

La Figura 47 describe la inmunoprecipitación de EGFR a partir de diferentes líneas celulares (U87MG Δ 2-7, U87MG-wtEGFR y A431) con diferentes anticuerpos (SC-03, 806 y 528) en ausencia de (-) y después de la digestión con Endo H (+) para separar el elevado contenido de carbohidratos del tipo con alto contenido de manosa.

La Figura 48 describe la yodación en la superficie celular de las líneas celulares A431 y U87MG Δ 2-7 seguido de inmunoprecipitación con el anticuerpo 806, y con o sin digestión con Endo H, confirmando que el EGFR unido por el mAb 806 sobre la superficie celular de las células A431 es una forma sensible a EndoH.

Descripción detallada

De acuerdo con la presente invención se pueden emplear mecanismos de la biología molecular, la microbiología, y el ADN recombinante convencionales dentro del conocimiento práctico de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura. Véase, p. ej., Sambrook *et al.*, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” (1989); “Current Protocols in Molecular Biology” Volúmenes I-III [Ausubel, R. M., ed. (1994)]; “Cell Biology: A Laboratory Handbook” Volúmenes I-III [J. E. Celis, ed. (1994)]; “Current Protocols in Immunology” Volúmenes I-III [Coligan, J. E., ed. (1994)]; “Oligonucleotide Synthesis” (M.J. Gait ed. 1984); “Nucleic Acid Hybridization” [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; “Transcription And Translation” [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]; “Animal Cell Culture” [R.I. Freshney, ed. (1986)]; “Immobilized Cells And Enzymes” [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, “A Practical Guide To Molecular Cloning” (1984).

Por lo tanto, si aparecen en la memoria, los siguientes términos tendrán las definiciones expuestas más abajo.

15 A. Terminología

El término “miembro de unión específica” describe un miembro de un par de moléculas que tienen especificidad de unión entre sí. Los miembros de un par de unión específico pueden ser obtenidos naturalmente o producidos sintéticamente parcial o totalmente. Un miembro del par de moléculas tiene una zona sobre su superficie, o una cavidad, que se une específicamente y por lo tanto es complementaria a una organización espacial y polar concreta del otro miembro del par de moléculas. De este modo los miembros del par tienen la propiedad de unirse específicamente entre sí. Los ejemplos de los tipos de pares de unión específica son antígeno-anticuerpo, biotina-avidina, hormona-receptor de hormona, receptor-ligando, enzima-sustrato. Esta solicitud se ocupa de las reacciones de tipo antígeno-anticuerpo.

El término “expresión aberrante” en sus diferentes formas gramaticales puede significar e incluir cualquier expresión aumentada o alterada o expresión en exceso de una proteína en un tejido, *p. ej.* un incremento en la cantidad de una proteína, causado por cualquier método incluyendo un aumento de la expresión o traducción, una modulación del promotor o un regulador de la proteína, una amplificación de un gen de una proteína, o un aumento de la vida media o la estabilidad, de manera que existe o se puede detectar en cualquier momento más proteína, en contraste con un estado sin expresión en exceso. La expresión aberrante incluye y contempla cualquier escenario o alteración en el que la expresión de la proteína o la maquinaria de modificación post-traduccional en una célula es exigida o interrumpida de otro modo debido a un aumento de la expresión o a un incremento de los niveles o cantidades de una proteína, incluyendo cuando se expresa una proteína alterada, en forma de una proteína mutada o variante debido a una alteración, delección o inserción de la secuencia, o a un plegamiento alterado.

Es importante apreciar que el término “expresión aberrante” ha sido seleccionado específicamente en la presente memoria para abarcar el estado en el que están presentes cantidades/niveles anormales (normalmente incrementados) de la proteína, con independencia de la causa eficaz de esa cantidad o nivel anormal. De este modo, las cantidades anormales de proteína puede resultar de la expresión en exceso de la proteína en ausencia de amplificación del gen, que es el caso *p. ej.* en muchas muestras de células/tejidos tomadas de la cabeza y el cuello de sujetos con cáncer, mientras otras muestras exhiben niveles anormales de proteína atribuibles a amplificación génica.

Con respecto a esto último, algunos de los trabajos de los autores de la presente invención que se presentan en la presente memoria para ilustrar la invención incluyen el análisis de muestras, algunas de las cuales muestran niveles de proteína anormales resultantes de la amplificación de EGFR. Esto por lo tanto explica la presentación en la presente memoria de descubrimientos experimentales en los que se hace referencia a la amplificación y el uso de los términos “amplificación/amplificado” y similares al describir niveles anormales de EGFR. No obstante, es la observación de las cantidades o niveles anormales de la proteína la que define el entorno o la circunstancia en la que se contempla la intervención clínica como recurso para los miembros de unión de la invención, y por esta razón, la presente memoria considera que el término “expresión aberrante” capta más ampliamente el entorno causal que produce la correspondiente anomalía en los niveles de EGFR.

Por consiguiente, mientras se entiende que los términos “expresión en exceso” y “amplificación” en sus diferentes formas gramaticales tienen significados técnicos distintos, se deben considerar equivalentes entre sí, en tanto que representan el estado en el que están presentes los niveles anormales de proteína EGFR en el contexto de la presente invención. Por consiguiente, el término “expresión aberrante” ha sido seleccionado ya que se cree que subsume los términos “expresión en exceso” y “amplificación” dentro de su alcance para los fines de la presente memoria, de manera que todos los términos pueden ser considerados equivalentes entre sí según se utilizan en la presente memoria.

El término “anticuerpo” describe una inmunoglobulina ya sea natural o producida parcial o totalmente sintéticamente. El término también abarca cualquier polipéptido o proteína que tenga un dominio de unión que sea, o sea homólogo a, un dominio de unión de un anticuerpo. Este término también contempla los anticuerpos injertados con CDR.

Como los anticuerpos pueden ser modificados de varias maneras, se debe considerar que el término “anticuerpo” abarca cualquier miembro de unión específico o sustancia que tenga un dominio de unión con la especificidad requerida. De este modo, este término abarca fragmentos de anticuerpos, derivados, equivalentes funcionales y homólogos

de anticuerpos, incluyendo cualquier polipéptido que comprenda un dominio de unión de inmunoglobulina, ya sea natural o total o parcialmente sintético. Por lo tanto se incluyen las moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión de inmunoglobulina, o equivalente, fusionado a otro polipéptido. La clonación y expresión de los anticuerpos quiméricos se describen en los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023 y en las Patentes de los Estados Unidos
 5 Núms. 4.816.397 y 4.816.567.

Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de unirse a antígenos. Los ejemplos de los fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL
 10 y VH de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward, E.S. *et al.*, Nature 341, 544-546 (1989)) que consiste en un dominio VH; (v) las regiones CDR aisladas; (vi) los fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalentes que comprende dos fragmentos Fab unidos (vii) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv), donde un dominio VH y un dominio VL están unidos por un conector peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a un antígeno (Bird *et al.*, Science, 242, 423-426, 1988; Huston *et al.*, PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988); (viii) frag-
 15 mentos de anticuerpos multivalentes (dímeros scFv, trímeros y/o tetrámeros (Power y Hudson, J Immunol. Methods 242: 193-204 9 (2000)) (ix) dímeros Fv de cadena sencilla biespecíficos (PCT/US92/09965) y (x) "fragmentos biespecíficos" (diabodies), fragmentos multivalentes o multispecíficos construidos mediante fusión génica (documento WO94/13804; P. Holliger *et al* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, (1993)).

Un "sitio de combinación de un anticuerpo" es aquella porción estructural de una molécula de anticuerpo comprendida por regiones variables e hipervariables de la cadena ligera o la cadena pesada y ligera que se une específicamente al antígeno.

La frase "molécula de anticuerpo" en sus diferentes formas gramaticales según se utiliza en la presente memoria contempla tanto una molécula de inmunoglobulina intacta como una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina.

Las moléculas de anticuerpo ilustrativas son moléculas de inmunoglobulina intactas, moléculas de inmunoglobulina esencialmente intactas y aquellas porciones de una molécula de inmunoglobulina que contienen el parátipo, incluyendo aquellas porciones conocidas en la técnica tales como Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v), cuyas porciones se prefieren para su uso en los métodos terapéuticos descritos en la presente memoria.

Los anticuerpos también pueden ser biespecíficos, donde un dominio de unión del anticuerpo es un miembro de unión específica de la invención, y el otro dominio de unión tiene una especificidad diferente, *p. ej.* para reclutar una función efectora o similar. Los anticuerpos biespecíficos de la presente invención incluyen el caso en el que un dominio de unión del anticuerpo es un miembro de unión específico de la presente invención, incluyendo uno de sus fragmentos, y el otro dominio de unión es un anticuerpo distinto o uno de sus fragmentos, incluyendo un anticuerpo anti-EGFR distinto, por ejemplo el anticuerpo 528 (Patente de los Estados Unidos Núm. 4.943.533), el anticuerpo 225 quimérico y humanizado (Patente de los Estados Unidos Núm. 4.943.533 y documento WO/9640210), un anticuerpo anti-de-
 40 7 tal como DH8.3 (Hills, D. *et al* (1995) Int. J. Cancer 63(4):537-543), un anticuerpo L8A4 y Y10 (Reist, CJ *et al* (1995) Cancer Res. 55(19):4375-4382; Foulon CF *et al.* (2000) Cancer Res. 60(16):4453-4460), ICR62 (Modjtahedi H *et al* (1993) Cell Biophys. Enero-Junio; 22(1.3):129-46; Modjtahedi *et al* (2002) P.A.A.C.R. 55(14):3140-3148, o el anticuerpo de Wikstrand *et al* (Wikstrand C. *et al* (1995) Cancer Res. 55(14):3140-3148). El otro dominio de unión puede ser un anticuerpo que reconoce o elige como diana un tipo concreto de célula, como en un anticuerpo específico de células neurales o gliales. En los anticuerpos biespecíficos de la presente invención el dominio de unión del anticuerpo de la invención se puede combinar con otros dominios de unión o moléculas que reconocen receptores celulares concretos y/o modulan células de una manera concreta, como por ejemplo un modulador inmunitario (*p. ej.*, interleuquina(s)), un modulador del crecimiento o citoquina (*p. ej.* factor de necrosis tumoral (TNF), y particularmente, la modalidad biespecífica de TNF mostrada en el documento U.S.S.N. 60/355,838 presentado el 13 de Febrero de
 45 50 2002) o una toxina (*p. ej.*, ricina) o un agente o factor anti-mitótico o apoptótico.

Las porciones Fab y F(ab')₂ de las moléculas de anticuerpo se pueden preparar mediante reacción proteolítica con papaína y pepsina, respectivamente, en moléculas de anticuerpo esencialmente intactas mediante métodos que son bien conocidos. Véase por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.342.566 de Theofilopolous *et al.* Las porciones de la molécula de anticuerpo Fab' también son bien conocidas y son producidas a partir de porciones F(ab')₂ seguido de reducción de los enlaces disulfuro que unen las dos porciones de la cadena pesada con mercaptoetanol, y seguido de alquilación del mercaptano de la proteína resultante con un reactivo tal como yodoacetamida. En la presente memoria se prefiere un anticuerpo que contiene moléculas de anticuerpo intactas.

La expresión "anticuerpo monoclonal" en sus diferentes formas gramaticales hace referencia a un anticuerpo que tiene solamente una especie de sitio de combinación del anticuerpo capaz de inmunorreaccionar con un antígeno concreto. Un anticuerpo monoclonal presenta de ese modo una única afinidad de unión por cualquier antígeno con el cual inmunorreacciona. Un anticuerpo monoclonal también puede contener una molécula de anticuerpo que tenga una pluralidad de sitios de combinación de anticuerpos, cada uno inmuno-específico para un antígeno diferente; *p. ej.*, un anticuerpo monoclonal biespecífico (quimérico).

El término "dominio de unión al antígeno" describe la parte de un anticuerpo que comprende la zona que se une específicamente y es complementario a una parte o a todo un antígeno. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo

ES 2 334 494 T3

se puede unir a una parte concreta del antígeno solamente, cuya parte se denomina epítipo. Un dominio de unión a un antígeno puede ser proporcionado por uno o más dominios variables de un anticuerpo. Preferiblemente, un dominio de unión a un antígeno comprende una región variable de una cadena ligera del anticuerpo (VL) y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo (VH).

5

“Modificación post-traducciona” puede abarcar una modificación cualquiera o una combinación de modificaciones, incluyendo una modificación covalente, que experimenta una proteína una vez que la traducción se ha completado y después de haber sido liberada desde el ribosoma o sobre el polipéptido naciente co-traduccionalmente. La modificación post-traducciona incluye pero no está limitada a fosforilación, miristoilación, ubicuitinación, glicosilación, anclaje de coenzima, metilación y acetilación. La modulación post-traducciona puede modular o influir en la actividad de una proteína, en su destino intracelular o extracelular, en su estabilidad o vida media, y/o su reconocimiento por ligandos, receptores u otras proteínas. La modificación post-traducciona se puede producir en orgánulos celulares, en el núcleo o citoplasma o extracelularmente.

10

El término “específico” se puede utilizar para hacer referencia a la situación en la que un miembro de un par de unión específico no mostrará ninguna unión significativa con moléculas distintas de su compañero o compañeros de unión específica. El término también es aplicable *p. ej.* cuando un dominio de unión al antígeno es específico para un epítipo concreto que es portado por numerosos antígenos, en cuyo caso el miembro de unión específica que lleva el dominio de unión al antígeno será capaz de unirse a los diferentes antígenos que lleven el epítipo.

20

El término “comprende” se utiliza generalmente en el sentido de incluye, es decir que permite la presencia de uno o más rasgos o componentes.

25

El término “que consiste esencialmente en” hace referencia a un producto, particularmente una secuencia peptídica, de un número definido de restos que no está anclado covalentemente a un producto más grande. En el caso del péptido de la invención referido antes, los expertos en la técnica apreciarán que se pueden contemplar sin embargo modificaciones menores en el extremo N o C del péptido, tales como la modificación química del extremo para añadir un grupo protector o similar, *p. ej.* la amidación del extremo C.

30

El término “aislado” hace referencia al estado en el que estarán los miembros de unión específica de la invención, o el ácido nucleico o que codifica tales miembros de unión, de acuerdo con la presente invención. Los miembros y el ácido nucleico estarán libres o esencialmente libres de material con el cual están asociados naturalmente tales como otros polipéptidos o ácido nucleicos que se encuentran en su entorno natural, o el entorno en el cual se preparan (*p. ej.* cultivo celular) cuando semejante preparación es mediante tecnología de ADN recombinante practicada *in vitro* o *in vivo*. Los miembros y ácidos nucleicos se pueden formular con diluyentes o coadyuvantes e incluso con fines prácticos pueden ser aislados - por ejemplo los miembros se mezclarán normalmente con gelatina u otros portadores si se utilizan para recubrir placas para su uso en inmunoanálisis, o se mezclarán con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables cuando se utilicen en diagnóstico o terapia. Los miembros de unión específica pueden estar glicosilados, naturalmente o por medio de sistemas de células eucarióticas heterólogas, o pueden no estar glicosilados (por ejemplo si se producen mediante la expresión en una célula procariótica).

35

40

Asimismo, según se utiliza en la presente memoria, los términos “glicosilación” y “glicosilado” incluyen y abarcan la modificación post-traducciona de las proteínas, denominadas glicoproteínas, mediante la adición de oligosacáridos. Los oligosacáridos se añaden en sitios de glicosilación de las glicoproteínas, incluyendo particularmente oligosacáridos unido a N y oligosacáridos unidos O. Los oligosacáridos unidos a N se añaden en un resto Asn, particularmente cuando el resto Asn está en la secuencia N-X-S/T, donde X no puede ser Pro ni Asp, y son los más comunes encontrados en las glicoproteínas. En la biosíntesis glicoproteínas unidas a N, se forma primero un oligosacárido de tipo alto contenido de manosa (formado generalmente por dolicol, N-Acetilglucosamina, manosa y glucosa en el retículo endoplásmico (RE)). Después las glicoproteínas de tipo alto contenido de manosa se transportan desde el RE al aparato de Golgi, donde se producen un procesamiento y modificación adicionales de los oligosacáridos. Los oligosacáridos unidos a N se añaden al grupo hidroxilo de los restos Ser o Thr. En los oligosacáridos unidos a o, primero se transfiere N-Acetilglucosamina al resto Ser o Thr por medio de la N-Acetilglucosaminiltransferasa en el RE. La proteína se mueve después al aparato de Golgi donde se producen una modificación y una elongación de la cadena por adición. Las modificaciones unidas a O se pueden producir con la simple adición del monosacárido OGlcNAc monosacárido solo en aquellos sitios de Ser o Thr que también pueden ser fosforilados en condiciones diferentes en lugar de glicosilados.

50

55

Según se utiliza en la presente memoria, “pg” representa picogramos, “ng” representa nanogramos, “ug” o “μg” representan microgramos, “mg” representa miligramos, “ul” o “μl” representa microlitros, “ml” representa mililitros, “l” representa litros.

60

Los términos “anticuerpo 806”, “mAb806”, “ch806” y cualquiera de las variantes no enumerada específicamente, pueden ser utilizados en la presente memoria indistintamente, y según se utilizan en la presente solicitud y en las reivindicaciones hacen referencia a material proteináceo incluyendo proteínas individuales o múltiples, y se extiende a aquellas proteínas que tienen los datos de la secuencia de aminoácidos descritos en la presente memoria y presentados en el SEQ ID NO: 2 y el SEQ ID NO: 4, y el anticuerpo quimérico ch806 que se incorpora y forma parte de los SEQ ID NO: 7 y 8, y el perfil de actividades expuesto en la presente memoria y en las Reivindicaciones. Por consiguiente, se contemplan del mismo modo las proteínas que presentan una actividad esencialmente equivalente o alterada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, por ejemplo, tales como las modificaciones obtenidas a través de la mutagé-

65

ES 2 334 494 T3

nesis dirigida al sitio, o puede ser accidental, tales como las obtenidas a través de mutaciones en anfitriones que son productores del complejo o sus denominadas subunidades. Asimismo, se pretende que los términos "anticuerpo 806", "mAb806" y "ch806" incluyan en su alcance proteínas citadas específicamente en la presente memoria así como todos los análogos y variaciones alélicas esencialmente homólogos.

5

Se prefiere que los restos aminoácido descritos en la presente memoria estén en forma isomérica "L". Sin embargo, los restos en forma isomérica "D" se pueden sustituir por cualquier resto aminoácido L, con tal que el polipéptido conserve la propiedad funcional de unión a inmunoglobulina deseada. NH₂ hace referencia al grupo amino libre presente en el extremo amino de un polipéptido. COOH hace referencia al grupo carboxi libre presente en el extremo carboxi de un polipéptido. De acuerdo con la nomenclatura de polipéptidos convencional, J. Biol. Chem., 243:3552-59 (1969), las abreviaturas para los restos aminoácido se muestran en la siguiente Tabla de Correspondencias:

TABLA DE CORRESPONDENCIAS

15

SÍMBOLO		AMINOÁCIDO
<u>1-Letra</u>	<u>3-Letras</u>	
Y	Tyr	tirosina
G	Gly	glicina
F	Phe	fenilalanina
M	Met	metionina
A	Ala	alanina
S	Ser	serina
I	Ile	isoleucina
L	Leu	leucina
T	Thr	treonina
V	Val	valina
P	Pro	prolina
K	Lys	lisina
H	His	histidina
Q	Gln	glutamina
E	Glu	ácido glutámico
W	Trp	triptófano
R	Arg	arginina
D	Asp	ácido aspártico
N	Asn	asparagina
C	Cys	cisteína

65

ES 2 334 494 T3

Se debe observar que todas las secuencias de restos aminoácido se representan en la presente memoria mediante fórmulas cuya orientación izquierda y derecha está en la orientación convencional de extremo amino a extremo carboxi. Además, se debe observar que un guión al principio o al final de una secuencia de restos aminoácido indica un enlace peptídico a una secuencia adicional de uno o más restos aminoácido. La Tabla anterior se presenta para relacionar las notaciones de tres letras y una letra que pueden aparecer de manera alternativa en la presente memoria.

Un “replicón” es cualquier elemento genético (*p. ej.*, plásmido, cromosoma, virus) que funciona como unidad autónoma de replicación de ADN *in vivo*; es, susceptible de replicación bajo su propio control.

Un “vector” es un replicón, tal como un plásmido, fago o cósmido, al que se puede anclar otro segmento de ADN con el fin de ocasionar la replicación del segmento anclado.

Una “molécula de ADN” hace referencia la forma polimérica de los desoxirribonucleótidos (adenina, guanina, timina, o citosina) en su forma de hebra sencilla, o en una hélice de doble hebra. Este término hace referencia solamente a la estructura primaria y secundaria de la molécula, y no se limita a ninguna de sus formas terciarias concretas. De este modo, este término incluye ADN de doble hebra encontrado, entre otros, en moléculas de ADN lineal (*p. ej.*, fragmentos de restricción), virus, plásmidos, y cromosomas. En el estudio de la estructura de moléculas de ADN de doble hebra concretas, las secuencias pueden ser descritas en la presente memoria de acuerdo con la convención normal de dar solamente la secuencia en dirección 5’ a 3’ junto con la hebra no transcrita de ADN (esto es, la hebra que tiene una secuencia homóloga al ARNm).

Un “origen de replicación” hace referencia a aquellas secuencias de ADN que participan en la síntesis de ADN.

Una “secuencia codificante” de ADN es una secuencia de ADN de doble hebra que es transcrita y traducida a un polipéptido *in vivo* cuando se coloca abajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante están determinados por un codón de inicio en el extremo 5’ (amino) y un codón de parada de la traducción en el extremo 3’ (carboxilo). Una secuencia codificante puede incluir, pero no está limitada a, secuencias procarióticas, ADNc de ARNm eucariótico, secuencias de ADN genómico de ADN eucariótico (*p. ej.*, de mamífero), e incluso secuencias de ADN sintéticas. Una señal de poliadenilación y una secuencia de terminación de la transcripción están localizadas normalmente en 3’ con respecto a la secuencia codificante.

Las secuencias de control transcripcional y traduccional son secuencias reguladoras de ADN, tales como promotores, intensificadores, señales de poliadenilación, terminadores, y similares, que proporcionan la expresión de una secuencia codificante en una célula anfitriona.

Una “secuencia promotora” es una región reguladora de ADN susceptible de unirse a la ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificante aguas abajo (dirección 3’). Con el fin de definir la presente invención, la secuencia promotora es unida en su extremo 3’ por el sitio de inicio de la transcripción y se extiende aguas arriba (dirección 5’) para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectables por encima del fondo. En la secuencia promotora se encontrará un sitio de inicio de la transcripción (definido convenientemente por el mapeo con nucleasa S1), como también los dominios de unión a proteínas (secuencias consenso) responsables de la unión de la ARN polimerasa. Los promotores eucarióticos comprenderán, a menudo, cajas “TATA” y cajas “CAT”. Los promotores procarióticos contienen secuencias de Shine-Dalgarno además de las secuencias consenso -10 y -35.

Una “secuencia de control de la expresión” es una secuencia de ADN que controla y regula la transcripción y la traducción de otra secuencia de ADN. Una secuencia codificante está bajo el control de las secuencias de control transcripcional y traduccional en una célula cuando la ARN polimerasa transcribe la secuencia codificante a ARNm, que después es traducido a la proteína codificada por la secuencia codificante.

Se puede incluir una “secuencia señal” antes de la secuencia codificante. Esta secuencia codifica un péptido señal, N-terminal con respecto al polipéptido, que se comunica con la célula anfitriona para dirigir el polipéptido a la superficie celular o secretar el polipéptido al medio, y este péptido señal desenganchado por la célula anfitriona antes de que la proteína deje la célula. Se pueden encontrar secuencias señal asociadas con una variedad de proteínas nativas de procariotas y eucariotas.

El término “oligonucleótido,” según se utiliza en la presente memoria en referencia a la sonda de la presente invención, se define como una molécula comprendida por dos o más ribonucleótidos, preferiblemente más de tres. Su tamaño exacto dependerá de muchos factores que, a su vez, dependerán de la función y uso últimos del oligonucleótido.

El término “cebador” según se utiliza en la presente memoria hace referencia a un oligonucleótido, ya sea de origen natural en forma de un producto purificado de la digestión con enzimas de restricción ya sea producido sintéticamente, que es capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión con cebadores, que es complementario a una hebra del ácido nucleico, esto es, en presencia de nucleótidos y un agente inductor tal como una ADN polimerasa y a una temperatura y pH adecuados. El

ES 2 334 494 T3

5 cebador puede ser de hebra sencilla o de doble hebra y debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis del producto de extensión deseado en presencia del agente inductor. La longitud exacta del cebador dependerá de muchos factores, incluyendo la temperatura, la fuente del cebador y el uso del método. Por ejemplo, para aplicaciones diagnósticas, dependiendo de la complejidad de la secuencia diana, el cebador oligonucleotídico contiene típicamente 15-25 o más nucleótidos, aunque puede contener menos nucleótidos.

10 Los cebadores de la presente memoria se seleccionan para que sean “esencialmente” complementarios a diferentes hebras de una secuencia de ADN diana concreta. Esto representa que los cebadores deben ser suficientemente complementarios para hibridar con sus respectivas hebras. Por lo tanto, no es necesario que la secuencia del cebador refleje la secuencia exacta del molde. Por ejemplo, se puede anclar un fragmento nucleotídico no complementario al extremo 5' del cebador, siendo el resto de la secuencia del cebador complementaria a la hebra. Alternativamente, se pueden intercalar bases no complementarias o secuencias más largas en el cebador, siempre que la secuencia del cebador sea suficientemente complementaria a la secuencia de la hebra para hibridar con ellas y formar de ese modo el molde para la síntesis del producto de extensión.

15 Según se utilizan en la presente memoria, los términos “endonucleasas de restricción” y “enzimas de restricción” hacen referencia de enzimas bacterianas, cada una de las cuales cortan el ADN de doble hebra en o cerca de una secuencia de nucleótidos específica.

20 Una célula ha sido “transformada” por ADN exógeno o heterólogo cuando semejante ADN ha sido introducido dentro de la célula. El ADN transformante puede ser integrado o no (unido covalentemente) en el ADN cromosómico completando el genoma de la célula. En procariontes, levadura, y células de insecto por ejemplo, el ADN transformante puede ser mantenido sobre un elemento episómico tal como un plásmido. Con respecto a las células eucarióticas, una célula transformada establemente es aquella en la se ha integrado ADN transformante en el cromosoma de manera que es heredado por las células hijas a través de la replicación del cromosoma. Esta estabilidad se demuestra por la capacidad de la célula eucariótica para establecer líneas celulares o clones comprendidos por una población de células hijas que contienen el ADN transformante. Un “clon” es una población de células derivadas de una única célula o ancestro común por mitosis. Una “línea celular” es un clon de una célula primaria que es susceptible de crecimiento estable *in vitro* durante muchas generaciones.

30 Dos secuencias de ADN son “esencialmente homólogas” cuando al menos aproximadamente 75% (preferiblemente al menos aproximadamente 80%, y muy preferiblemente al menos aproximadamente 90 o 95%) de los nucleótidos se emparejan a lo largo de una longitud definida de las secuencias de ADN. Las secuencias que son esencialmente homólogas se pueden identificar comparando las secuencias utilizando un soporte lógico convencional en los bancos de datos de secuencias, o en un experimento de hibridación de Southern, por ejemplo, en condiciones restrictivas definidas para ese sistema concreto. La definición de las condiciones de hibridación apropiadas está dentro del alcance del experto en la técnica. Véanse, *p. ej.*, Maniatis *et al.*, *supra*; DNA Cloning, Vols. I & II, *supra*; Nucleic Acid Hybridization, *supra*.

40 Se debe apreciar que también están dentro del alcance de la presente invención las secuencias de ADN que codifican miembros de unión específica (anticuerpos) de la invención que codifican *p. ej.* un anticuerpo que tiene la misma secuencia de aminoácidos como el SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, pero que son degenerados para el SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4. Por “degenerado para” se quiere significar que se utiliza un codón de tres letras diferente para especificar un aminoácido concreto. Es bien sabido en la técnica que se pueden utilizar los siguientes codones indistintamente para codificar cada aminoácido específico:

50 (Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

ES 2 334 494 T3

	Fenilalanina (Phe o F)	UUU o UUC
5	Leucina (Leu o L)	UUA o UUG o CUU o CUC o CUA o CUG
	Isoleucina (Ile o I)	AUU o AUC o AUA
10	Metionina (Met o M)	AUG
	Valina (Val o V)	GUU o GUC of GUA o GUG
15	Serina (Ser o S)	UCU o UCC o UCA o UCG o AGU o AGC
	Prolina (Pro o P)	CCU o CCC o CCA o CCG
20	Treonina (Thr o T)	ACU o ACC o ACA o ACG
	Alanina (Ala o A)	GCU o GCG o GCA o GCG
25	Tirosina (Tyr o Y)	UAU o UAC
	Histidina (His o H)	CAU o CAC
30	Glutamina (Gln o Q)	CAA o CAG
	Asparagina (Asn o N)	AAU o AAC
35	Lisina (Lys o K)	AAA o AAG
	Ácido Aspártico (Asp o D)	GAU o GAC
40	Ácido Glutámico (Glu o E)	GAA o GAG
	Cisteína (Cys o C)	UGU o UGC
45	Arginina (Arg o R)	CGU o CGC o CGA o CGG o AGA o AGG
	Glicina (Gly o G)	GGU o GGC o GGA o GGG
50	Triptófano (Trp o W)	UGG
55	Codón de Terminación	UAA (ocre) o UAG (ámbar) o UGA (ópalo)

Se debe entender que los codones especificados antes son para las secuencias de ARN. Los correspondientes codones para ADN tienen U sustituido por T.

Se pueden realizar mutaciones en el SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 de manera que se cambia un codón por un codón que codifica un aminoácido diferente. Semejante mutación se realiza generalmente llevando a cabo los menores cambios de nucleótidos posibles. Se puede realizar una mutación por sustitución de esta clase para cambiar un aminoácido de la proteína resultante de una manera no conservativa (esto es, cambiando el codón de un aminoácido perteneciente a un agrupamiento de aminoácidos que tiene un tamaño concreto o característico por un aminoácido perteneciente a otro agrupamiento) o de una manera conservativa (esto es, cambiando el codón de un aminoácido perteneciente a un agrupamiento de aminoácidos que tiene un tamaño concreto o característico por un aminoácido

ES 2 334 494 T3

5 perteneciente al mismo agrupamiento). Semejante cambio conservativo conduce generalmente a un cambio menor en la estructura y función de la proteína resultante. Es más probable que un cambio no conservativo altere la estructura, actividad o función de la proteína resultante. Se debe considerar que la presente invención incluye secuencias que contienen cambios conservativos que no alteran significativamente la actividad o características de unión de la proteína resultante.

Lo siguiente es un ejemplo de diferentes agrupamientos de aminoácidos:

10 Aminoácidos con grupos R no polares

Alanina, Valina, Leucina, Isoleucina, Prolina, Fenilalanina, Triptófano, Metionina

15 Aminoácidos con grupos R polares no cargados

Glicina, Serina, Treonina, Cisteína, Tirosina, Asparagina, Glutamina

20 Aminoácidos con grupo R polares cargados (cargados negativamente a pH 6,0)

Ácido Aspártico, Ácido Glutámico

25 Aminoácidos Alcalinos (cargados positivamente a pH 6,0)

Lisina, Arginina, Histidina (a pH 6,0)

30 Otros agrupamientos pueden ser aquellos aminoácidos con grupos Fenilo:

Fenilalanina, Triptófano, Tirosina

35 Otro agrupamiento puede ser de acuerdo con el peso molecular (esto es, tamaño de los grupos R):

40	Glicina	75
	Alanina	89
45	Serina	105
	Prolina	115
	Valina	117
50	Treonina	119
	Cisteína	121

55

60

65

ES 2 334 494 T3

	Leucina	131
5	Isoleucina	131
	Asparagina	132
10	Ácido aspártico	133
	Glutamina	146
15	Lisina	146
	Ácido glutámico	147
20	Metionina	149
	Histidina (a pH 6,0)	155
25	Fenilalanina	165
	Arginina	174
30	Tirosina	181
	Triptófano	204

35 Las sustituciones particularmente preferidas son:

- Lys por Arg y viceversa de manera que se puede mantener una carga positiva;
- 40 • Glu por Asp y viceversa de manera que se puede mantener una carga negativa;
- Ser por Thr de manera que se puede mantener un -OH libre; y
- Gln por Asn de manera que se puede mantener un NH₂ libre.

45 Las sustituciones de aminoácidos también se pueden introducir para sustituir un aminoácido con una propiedad particularmente preferible. Por ejemplo, se puede introducir una Cys en un sitio potencial para puentes disulfuro con otra Cys. Se puede introducir una His en un sitio particularmente “catalítico” (esto es, His puede actuar como
50 ácido o base y es el aminoácido más común en catálisis bioquímica). Se puede introducir Pro debido a su estructura particularmente plana, que induce giros β en la estructura de la proteína.

55 Dos secuencias de aminoácidos son “esencialmente homólogas” cuando al menos aproximadamente 70% de los restos aminoácido (preferiblemente al menos aproximadamente 80%, y muy preferiblemente al menos aproximadamente 90 o 95%) son idénticos, o representan sustituciones conservativas.

60 Una región “heteróloga” del constructo de ADN es un segmento identificable de ADN dentro de una molécula de ADN más grande que no se encuentra asociado con la molécula más grande en la naturaleza. De este modo, cuando la región heteróloga codifica un gen de mamífero, el gen estará flanqueado normalmente por ADN que no flanquea el ADN genómico de mamífero en el genoma del organismo de origen. Otro ejemplo de secuencia codificante heteróloga es un constructo en el que la propia secuencia codificante no se encuentra en la naturaleza (*p. ej.*, un ADNc donde la secuencia codificante genómica contiene intrones, o secuencias sintéticas que tienen codones diferentes a los del gen nativo). Las variaciones alélicas o los eventos mutacionales que ocurren naturalmente no dan lugar a una región heteróloga de ADN como se define en la presente memoria.

65 La expresión “farmacéuticamente aceptable” hace referencia a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y no producen típicamente una reacción alérgica o perjudicial similar, tal como trastorno gástrico, mareo y similares, cuando se administran a un ser humano.

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se utiliza en la presente memoria para representar una cantidad suficiente para evitar, y preferiblemente reducir el menos en un 50 por ciento, preferiblemente al menos un 70 por ciento, preferiblemente al menos 80 por ciento, preferiblemente al menos 90%, un cambio clínicamente significativo en el crecimiento o progreso o actividad mitótica de una masa celular, grupo de células cancerosas o tumor diana, u otro rasgo de la patología. Por ejemplo, se puede reducir el grado de activación o actividad o cantidad de EGFR o el número de células positivas para EGFR, particularmente de anticuerpos o miembros de unión reactivos o de células positivas.

Una secuencia de ADN está “conectada operativamente” a una secuencia de control de la expresión cuando la secuencia de control de la expresión controla y regula la transcripción y traducción de esa secuencia de ADN. El término “conectado operativamente” incluye que tiene una señal de inicio apropiada (*p. ej.*, ATG) delante de la secuencia de ADN que se va a expresar y que mantiene el marco de lectura correcto para permitir la expresión de la secuencia de ADN bajo el control de la secuencia de control de la expresión y la producción del producto deseado codificado por la secuencia de ADN. Si el gen que se desea insertar en una molécula de ADN recombinante no contiene una señal de inicio apropiada, semejante señal de inicio se puede insertar delante del gen.

El término “condiciones de hibridación convencionales” hace referencia a unas condiciones de sal y temperatura esencialmente equivalentes a 5 x SSC y 65°C tanto para la hibridación como para el lavado. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que semejantes “condiciones de hibridación convencionales” dependen de condiciones concretas incluyendo la concentración de sodio y magnesio en el tampón, la longitud y concentración de la secuencia de nucleótidos, el porcentaje de emparejamiento erróneos, el porcentaje de formamida, y similares. También es importante en la determinación de las “condiciones de hibridación convencionales” si las dos secuencias que hibridan son ARN-ARN, ADN-ADN o ARN-ADN. Tales condiciones de hibridación convencionales son determinadas fácilmente por un experto en la técnica de acuerdo con fórmulas bien conocidas, donde la hibridación es típicamente 10-20°C más baja que la T_m pronosticada o determinada con lavados de mayor restricción, si se desea.

B. Descripción detallada

La presente invención proporciona un anticuerpo aislado o uno de sus fragmentos que reconoce un epítipo de EGFR que se encuentra en células tumorigénicas o hiperproliferativas o células que expresan en exceso EGFR o que expresan un mutante de EGFR, donde dicho anticuerpo o fragmento activo del mismo (i) se une a EGFR de tipo salvaje humano unida a la célula solamente cuando el EGFR es amplificado o expresado en exceso; (ii) se une a de2-7 EGFR en un epítipo distinto del péptido de empalme del LEEKKGNVYVTDH y (iii) se une a un epítipo en la secuencia de restos 273-501 del EGFR de tipo salvaje humano.

El miembro de unión específica novedoso de la invención, concretamente un anticuerpo o uno de sus fragmentos, incluyendo los fragmentos inmunogénicos, reconoce un epítipo de EGFR que se encuentra en células tumorigénicas, hiperproliferativas o anómalas en las que el epítipo es aumentado o evidenciado tras la modificación post-traduccional aberrante y no detectable en células normales o de tipo salvaje. En una realización concreta pero no limitante, el miembro de unión, tal como el anticuerpo, reconoce un epítipo de EGFR que está aumentado o evidenciado tras una simple modificación de carbohidrato o una glicosilación temprana y es reducido o no evidente en presencia de una modificación compleja de carbohidratos o una glicosilación. El miembro de unión específica, tal como el anticuerpo o uno de sus fragmentos, no se une ni reconoce células normales o de tipo salvaje que contienen un epítipo EGFR normal o de tipo salvaje en ausencia de expresión en exceso y en presencia de una modificación post-traduccional de EGFR normal.

La invención se refiere a un miembro de unión específica, particularmente un anticuerpo o uno de sus fragmentos, que reconoce un epítipo de EGFR que está presente en células que expresan un EGFR amplificado o que expresan el de2-7 EGFR y no detectable en células que expresan EGFR normal o de tipo salvaje, particularmente en presencia de una modificación post-traduccional normal.

Se observa adicionalmente y se demuestra en la presente memoria que una observación o característica no limitante adicional de los anticuerpos de la presente invención es su reconocimiento de su epítipo en presencia de grupos con elevado contenido de manosa, que es una característica de la glicosilación temprana o la modificación simple de carbohidratos. De este modo, la glicosilación alterada o aberrante facilita la presencia y/o reconocimiento del epítipo del anticuerpo o comprende una porción del epítipo del anticuerpo.

La glicosilación incluye y abarca la modificación post-traduccional de proteínas, denominadas glicoproteínas, por adición de oligosacáridos. Los oligosacáridos se añaden en sitios de glicosilación en las glicoproteínas, incluyendo particularmente oligosacáridos unidos a N y oligosacáridos unidos a O. Los oligosacáridos unidos a N se añaden a un resto Asn, particularmente cuando el resto Asn está en la secuencia N-X-S/T, donde X no puede ser Pro ni Asp, y son los más comunes encontrados en la glicoproteínas. En la biosíntesis de las glicoproteínas unidas a N, se forma primero un oligosacárido de tipo alto contenido de manosa (comprendido generalmente por dolicol, N-Acetilglucosamina, manosa y glucosa en el retículo endoplásmico (RE). Las glicoproteínas de tipo elevado contenido de manosa se transportan después desde el RE al aparato de Golgi, donde se producen normalmente el procesado y modificación adicionales de los oligosacáridos. Los oligosacáridos unidos a O se añaden al grupo hidroxilo de los restos Ser o Thr. En los oligosacáridos unidos a O, primero se transfiere la N-Acetilglucosamina al resto Ser o Thr por

medio de la N-Acetilglucosaminiltransferasa en el RE. Después la proteína se traslada al aparato de Golgi donde se producen la modificación y la elongación de la cadena.

En un aspecto concreto de la invención y como se ha establecido antes, los autores de la presente invención han descubierto anticuerpos monoclonales novedosos, ilustrados en la presente memoria por el anticuerpo denominado mAb 806 y su quimérico ch806, que reconocen específicamente el EGFR de tipo salvaje amplificado y el de2-7 EGFR, se unen a un epítipo distinto del péptido de empale único de la mutación de2-7 EGFR. Los anticuerpos de la presente invención reconocen específicamente el EGFR expresado en exceso, incluyendo el EGFR amplificado y el EGFR mutante (ilustrado en la presente memoria por la mutación de2-7), particularmente tras la modificación post-traducciona aberrante. Adicionalmente, si bien mAb 806 no reconoce el EGFR de tipo salvaje normal expresado sobre la superficie celular de células de glioma, se une al dominio extracelular del EGFR inmovilizado sobre la superficie de placas ELISA, indicando un epítipo conformacional con un aspecto polipeptídico. En gran medida, mAb 806 no se unía específicamente a tejidos normales tales como hígado y piel, que expresan niveles de wt EGFR endógeno que son superiores que en la mayoría de los otros tejidos normales, ero en los que el EGFR no está expresado en exceso ni amplificado. De este modo, mAb806 demuestra una especificidad novedosa y útil, que reconoce de2-7 EGFR y EGFR amplificado, a la vez que no reconoce el EGFR de tipo salvaje normal o el único péptido de empalme que es característico de de2-7 EGFR.

En un aspecto preferido, el anticuerpo es uno que tiene las características del anticuerpo que los autores de la invención han identificado y caracterizado, en particular que reconoce el EGFR amplificado y el de2-7EGFR. En un aspecto particularmente preferido el anticuerpo es el mAb 806, o sus fragmentos activos. En un aspecto preferido adicional el anticuerpo de la presente invención comprende las secuencias de aminoácidos de VH y VL representadas en Figura 14 (SEQ ID NO: 2) y en la Figura 15 (SEQ ID NO: 4) respectivamente.

El epítipo del miembro de unión específica o anticuerpo se localiza en la región que comprende los restos 273-501 de la secuencia de EGFR normal o de tipo salvaje y de este modo las proteínas de unión específica proporcionadas tales como anticuerpos, se unen al de2-7 EGFR en un epítipo localizado en la región que comprende los restos 273-501 de la secuencia de EGFR. El epítipo puede ser determinado mediante cualquiera de las técnicas de mapeo epitópico convencionales conocidas por los expertos en la técnica. Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica los restos 273-501 podría ser digerida, y los fragmentos resultantes expresados en un anfitrión adecuado. La unión del anticuerpo se podría determinar como se ha mencionado antes.

En particular, el miembro se unirá a un epítipo que comprende los restos 273-501 del EGFR normal o de tipo salvaje maduro. No obstante también forman un aspecto de la invención otros anticuerpos que muestran el mismo patrón de reactividad o uno esencialmente similar. Esto se puede determinar comparando tales miembros con un anticuerpo que comprende los dominios VH y VL mostrados en el SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4 respectivamente. La comparación se hará típicamente utilizando una transferencia Western en la cual los miembros de unión se unen a transferencias duplicadas preparadas a partir de una preparación nuclear de células de manera que el patrón de unión se pueda comparar directamente.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo capaz de competir con el anticuerpo 806, en condiciones en las que se bloquea la unión de al menos el 10% de un anticuerpo que tiene las secuencias VH y VL del anticuerpo 806 con de2-7EGFR por competición con semejante anticuerpo en un análisis ELISA. Como se ha expuesto antes, en la presente memoria se contemplan y se ilustran anticuerpos anti-idiotípicos.

Un polipéptido aislado que consiste esencialmente en el epítipo que comprende los restos 273-501 del EGFR de tipo salvaje maduro (restos 6-234 del de2-7 EGFR maduro) forma otro aspecto de la presente invención. El péptido de la invención es particularmente útil en los análisis diagnósticos o kits y terapéuticamente o profilácticamente, incluyendo en forma de vacuna anti-tumoral o anti-cancerosa. De este modo las composiciones del péptido de la presente invención incluyen composiciones farmacéuticas y composiciones inmunogénicas.

Usos Diagnósticos y Terapéuticos

La especificidad única de los miembros de unión específica, concretamente anticuerpos o sus fragmentos, de la presente invención, que se definen en la reivindicación 1, proporciona usos diagnósticos y terapéuticos para identificar, seleccionar como diana y tratar, reducir o eliminar numerosos tipos de células tumorígenicas y tipos de tumores, por ejemplo tumores de cabeza y cuello, mama, pulmón, vejiga o próstata y glioma, sin los problemas asociados con la absorción por tejidos normales que se pueden observar con los anticuerpos para EGFR conocidos previamente. De este modo, las células que expresan EGFR en exceso (*p. ej.* por amplificación o expresión de un EGFR mutante o variante), particularmente aquellas que demuestran una modificación post-traducciona aberrante pueden ser reconocidas, aisladas, caracterizadas, elegidas como diana y tratadas o eliminadas utilizando el miembro o los miembros de unión, concretamente el anticuerpo o los anticuerpos o sus fragmentos de la presente invención.

Los anticuerpos de la presente invención pueden clasificar de este modo específicamente la naturaleza de los tumores o células tumorígenicas con EGFR, tiñendo o reconociendo de otro modo esos tumores o células en los que se encuentra presente la expresión en exceso de EGFR, concretamente la amplificación y/o la mutación de EGFR, particularmente de2-7EGFR. Adicionalmente, los anticuerpos de la presente invención, como ilustra mAb 806 y el

ES 2 334 494 T3

anticuerpo quimérico ch806, demuestran una actividad anti-tumoral *in vivo* significativa contra tumores que contienen EGFR amplificado y contra xenoinjertos de2-7 EGFR positivos.

Como se ha esbozado antes, los autores de la invención han descubierto que el miembro de unión específico de la invención reconoce las formas asociadas a tumores del EGFR (de2-7 EGFR y EGFR amplificado) pero no el receptor normal de tipo salvaje cuando es expresado en células normales. Se cree que el reconocimiento del anticuerpo depende de una modificación post-traducciona aberrante (*p. ej.*, una única variante de glicosilación, acetilación o fosforilación) del EGFR expresado en células que muestran una expresión en exceso del gen EGFR.

Como se describe más abajo, mAb 806 y ch806 han sido utilizados en estudios terapéuticos. Se demuestra que mAb 806 y ch806 inhiben el crecimiento de xenoinjertos con EGFR expresado en exceso (*p. ej.* amplificado) y de xenoinjertos de expresan de2-7 EGFR humano de tumores humanos e inducen una necrosis significativa en tales tumores.

Por otra parte, los anticuerpos de la presente invención inhiben el crecimiento de tumores intracraneales en un modelo representativo. Este modelo implica inyectar células de glioma que expresan de2-7 EGFR en ratones carentes de sistema inmunitario y después inyectar el anticuerpo intracranalmente o bien el mismo día o a los 1 a 3 días, opcionalmente con dosis repetidas. Las dosis de anticuerpo son adecuadamente de aproximadamente 10 μ g. Los ratones a los que se ha inyectado el anticuerpo se comparan con controles, y se ha descubierto que la supervivencia de los ratones tratados aumenta significativamente.

Por lo tanto, en un aspecto adicional de la invención, se proporciona un miembro de unión específico de la invención para su uso en un método de tratamiento de un tumor, un estado canceroso, un estado precanceroso, y cualquier estado relacionado con o resultante de un crecimiento celular hiperproliferativo.

Los anticuerpos de la presente invención se diseñan para ser utilizados en métodos de diagnóstico y tratamiento de tumores en sujetos humanos o animales, particularmente tumores epiteliales. Estos tumores pueden ser tumores sólidos primarios o secundarios de cualquier tipo incluyendo, pero no limitados a, glioma, tumores de mama, pulmón, próstata, cabeza o cuello.

Miembro de Unión y Generación de Anticuerpo

La metodología general para elaborar anticuerpos monoclonales por medio de hibridomas es bien conocida. También se pueden crear líneas celulares productoras de anticuerpos, inmortales mediante técnicas distintas de la fusión, tales como la transformación directa de linfocitos B con ADN oncogénico, o la transfección con virus Epstein-Barr. Véase, *p. ej.*, M. Schreier *et al.*, "Hybridoma Techniques" (1980); Hammerling *et al.*, "Monoclonal Antibodies And T-cell Hybridomas" (1981); Kennett *et al.*, "Monoclonal Antibodies" (1980); véanse también las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.341.761; 4.399.121; 4.427.783; 4.444.887; 4.451.570; 4.466.917; 4.472.500; 4.491.632; 4.493.890.

Los paneles de anticuerpos monoclonales producidos contra EFGR pueden ser escrutados en busca de diferentes propiedades; esto es, isotipo, epítipo, afinidad, etc. Tienen un interés particular los anticuerpos monoclonales que imitan la actividad del EFGR o sus subunidades. Tales monoclonales pueden ser fácilmente identificados en análisis de actividad de miembros de unión específica. Los anticuerpos de elevada afinidad también son útiles cuando es posible la purificación por inmunofinidad de un miembro de unión específica nativo o recombinante.

Los métodos para producir anticuerpos anti-EGFR policlonales son bien conocidos en la técnica. Véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.493.795 de Nestor *et al.* Se puede preparar un anticuerpo monoclonal, que contiene típicamente porciones Fab y/o F(ab')₂ de moléculas de anticuerpo útiles, utilizando la tecnología de hibridomas descrita en Antibodies - A Laboratory Manual, Harlow y Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1988). En resumen, para formar el hibridoma a partir del cual se produce la composición de anticuerpo monoclonal, se fusiona un mieloma u otra línea celular auto-perpetuante con linfocitos obtenidos del bazo de un mamífero hiperinmunizado con un EGFR apropiado.

Los esplenocitos se fusionan típicamente con células de mieloma utilizando polietilenglicol (PEG) 6000. Los híbridos fusionados se seleccionan por su sensibilidad a HAT. Los hibridomas que producen un anticuerpo monoclonal útil en la práctica de esta invención se identifican por su capacidad para inmunorreaccionar con el presente anticuerpo o miembro de unión y su capacidad para inhibir la actividad tumorigénica o hiperproliferativa en células diana.

Se puede producir un anticuerpo monoclonal útil en la práctica de la presente invención iniciando un cultivo de hibridoma monoclonal que comprende un medio nutriente que contiene un hibridoma que secreta moléculas de anticuerpo con la especificidad antigénica apropiada. El cultivo se mantiene en condiciones y durante un período de tiempo suficiente para que el hibridoma secreta las moléculas de anticuerpo al medio. Después se recoge el medio que contiene el anticuerpo. Las moléculas de anticuerpo se pueden aislar después mediante técnicas bien conocidas.

Los medios útiles para la preparación de estas composiciones son bien conocidos en la técnica y asequibles comercialmente e incluyen medios de cultivo sintéticos, ratones endogámicos y similares. Un medio sintético ilustrativo es el medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM; Dulbecco *et al.*, *Virol.* 8:396 (1959)) con un suplemento de 4,5 gm/l de glucosa, 20 mm de glutamina, y suero de ternera fetal al 20%. Una cepa de ratón endogámica ilustrativa es Balb/c.

ES 2 334 494 T3

Los métodos para producir anticuerpos anti-EGFR monoclonales también son bien conocidos en la técnica. Véase Niman *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:4949-4953 (1983). Típicamente, se utiliza el EGFR o un análogo peptídico solo o conjugado con un portador inmunogénico, como el inmunógeno del procedimiento descrito antes para producir anticuerpos monoclonales anti-EGFR. Los hibridomas se escrutan en busca de su capacidad para producir un anticuerpo que reacciona inmunológicamente con el EGFR presente en células tumorigénicas, anormales o hiperproliferativas. Otros anticuerpos anti-EGFR incluyen pero no están limitados al anticuerpo HuMAX-EGFR de Genmab/Medarex, el anticuerpo 108 (ATCC HB9764) y Patente de los Estados Unidos Núm. 6.217.866, y el anticuerpo 14E1 de Schering AG (Patente de los Estados Unidos Núm. 5.942.602).

10 *Miembros de Unión Recombinante, Quiméricos, Biespecíficos y Fragmentos*

En general, las regiones CDR3, que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas esencialmente como regiones CDR3 del SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4 serán portadas en una estructura que permite la unión de las regiones CDR3 a un antígeno tumoral. En el caso de la región CDR3 del SEQ ID NO: 4, esta es portada preferiblemente por la región VL del SEQ ID NO: 4.

Por “esencialmente expuesto” se quiere significar que las regiones CDR3 de la invención serán idénticas u altamente homólogas a las regiones especificadas del SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4. Por “altamente homóloga” se contempla que solamente se pueden realizar unas pocas sustituciones, preferiblemente de 1 a 8, preferiblemente de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 4, o de 1 a 3 o 1 o 2 sustituciones en las CDR.

La estructura para portar las CDR3 de la invención será generalmente de una secuencia de una cadena pesada o ligera de un anticuerpo o una de sus porciones sustanciales en las cuales las regiones CDR3 están localizadas en localizaciones correspondientes a la región CDR3 de dominios variables de anticuerpos VH y VL codificados por genes de inmunoglobulina reordenados. Las estructuras y localizaciones de dominios variables de inmunoglobulina se pueden determinar mediante la referencia a Kabat, E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4ª Edición. US Department of Health and Human Services. 1987, y sus actualizaciones, ahora disponible en Internet (<http://immuno.bme.nwu.edu>).

Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos expuesta esencialmente como restos 115-123 del SEQ ID NO: 2 es portada como CDR3 en un dominio variable de la cadena pesada humana o una de sus porciones esenciales, y las secuencias de aminoácidos expuestas esencialmente como restos 44-54, 70-76 y 109-117 del SEQ ID NO: 4 son portadas como CDR 1-3 respectivamente en un dominio variable de la cadena ligera humana o una de sus porciones esenciales.

Los dominios variables pueden derivar de cualquier línea germinal o dominio variable humano reordenado, o puede ser un dominio variable sintético basado en secuencias consenso de dominios variables humanos conocidos. Las secuencias derivadas de CDR3 de la invención, definidas en el párrafo anterior, pueden ser introducidas en un repertorio de dominios variables que carecen de regiones CDR3, utilizando la tecnología de ADN recombinante.

Por ejemplo, Marks *et al.* (Bio/Technology, 1992,10:779-783) describen métodos para producir repertorios de dominios variables de anticuerpos en los que se utilizan los cebadores consenso dirigidos a o adyacentes al extremo 5' de la zona del dominio variable junto con cebadores consenso para la tercera región marco de los genes VH humanos para proporcionar un repertorio de dominios variables de VH que carecen de CDR3. Marks *et al.* describen adicionalmente cómo este repertorio se puede combinar con una CDR3 de un anticuerpo concreto. Utilizando técnicas análogas, se pueden barajar las secuencias derivadas de CDR3 de la presente invención con repertorios de dominios de VH y VL combinados con un dominio de VL o VH cognado para proporcionar miembros de unión específica de la invención. Después se puede presentar el repertorio en un sistema anfitrión adecuado tal como el sistema de presentación en fagos del documento WO92/01047 de manera que se pueden seleccionar los miembros de unión específica adecuados. Un repertorio puede constar de 10^4 miembros individuales hacia arriba, por ejemplo de 10^6 a 10^8 o 10^{10} miembros.

El barajado o las técnicas combinatorias de análogos también son descritas por Stemmer (Nature, 1994, 370:389-391), que describe la técnica en relación con un gen de β -lactamasa pero observa que se puede utilizar el enfoque para la generación de anticuerpos.

Una alternativa adicional consiste en generar regiones VH y VL novedosas que portan las secuencias derivadas de CDR3 de la invención utilizando la mutagénesis al azar, por ejemplo, de los genes VH o VL de mAb806 para generar mutaciones en el dominio variable completo. Semejante técnica es descrita por Gram *et al.* (1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3576-3580), que utiliza la PCR con predisposición a errores.

Otro método que se puede utilizar consiste en dirigir la mutagénesis a regiones CDR de los genes VH o VL. Tales técnicas son descritas por Barbas *et al.*, (1994, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:3809-3813) y Schier *et al.* (1996, J. Mol. Biol. 263:551-567).

Todas las técnicas descritas antes se conocen como tales en la técnica y en sí mismas no forman parte de la presente invención. El experto en la técnica será capaz de utilizar tales técnicas para proporcionar miembros de unión específica de la invención utilizando la metodología rutinaria en la técnica.

Una porción esencial de un dominio variable de una inmunoglobulina comprenderá al menos las tres regiones CDR, junto con sus regiones marco intermedias. Preferiblemente, la porción también incluirá al menos aproximadamente 50% de cualquiera o de ambas regiones marco primera y cuarta, siendo el 50% C-terminal de la primera región marco y el 50% N-terminal de la cuarta región marco. Los restos adicionales en el extremo N-terminal o C-terminal de la porción esencial del dominio variable pueden ser aquellos no asociados normalmente con regiones de los dominios variables de origen natural. Por ejemplo, la construcción de miembros de unión específicos de la presente invención elaborados mediante técnicas de ADN recombinante puede dar como resultado la introducción de restos N- o C-terminales codificados por conectores introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Otras etapas de manipulación incluyen la introducción de conectores para unir dominios variables de la invención a secuencias de proteínas adicionales incluyendo cadenas pesadas de inmunoglobulina, otros dominios variables (por ejemplo en la producción de fragmentos biespecíficos) o marcas de proteína como se comenta con más detalle más abajo.

Aunque en un aspecto preferido de la invención se prefieren los miembros de unión específica que comprenden un par de dominios de unión basados en secuencias expuestas esencialmente en el SEQ ID NO: 2 y el SEQ ID NO: 4, los dominios de unión individuales basados en cualquiera de estas secuencias forman aspectos adicionales de la invención. En el caso de los dominios de unión basados en la secuencia expuesta esencialmente en el SEQ ID NO: 2, se pueden utilizar tales dominios de unión como agentes de direccionamiento para antígenos tumorales puesto que se sabe que los dominios VH de la inmunoglobulina son capaces de unirse a antígenos diana de una manera específica.

En el caso de cualquiera de los dominios de unión específica de cadena sencilla, se pueden utilizar estos dominios para escrutar en busca de dominios complementarios capaces de formar un miembro de unión específica de dos dominios que tiene propiedades *in vivo* tan buenas o iguales a las del anticuerpo mAb806 descrito en la presente memoria.

Esto se puede lograr mediante método de escrutinio de presentación en fagos utilizando el denominado enfoque combinatorio dual jerárquico descrito en la Patente de los Estados Unidos 5.969.108 en el que se utiliza una colonia individual que contiene un clon de la cadena H o L para infectar una genoteca completa de clones que codifican la otra cadena (L o H) y el miembro de unión específica de bicatenario resultante se selecciona de acuerdo con las técnicas de presentación en fagos tales como las descritas en esa referencia. Esta técnica también es descrita por Marks *et al*, *ibid*.

Los miembros de unión específica de la presente invención pueden comprender adicionalmente regiones constantes de anticuerpos o sus porciones. Por ejemplo, los miembros de unión específica basados en el SEQ ID NO: 4 se pueden anclar en su extremo C-terminal a dominios constantes de la cadena ligera de un anticuerpo incluyendo cadenas C κ o C λ , preferiblemente cadenas C λ . De un modo similar, los miembros de unión específica basados en el SEQ ID NO: 2 se pueden anclar en su extremo C-terminal a toda o parte de una cadena pesada de inmunoglobulina derivada de cualquier isotipo de anticuerpo, *p. ej.* IgG, IgA, IgE, IgD e IgM y cualquiera de las subclases de isotipos, concretamente IgG1, IgG2b, e IgG4. Se prefiere IgG1.

La llegada de la tecnología de los anticuerpos monoclonales (mAb) hace 25 años ha proporcionado un enorme repertorio de reactivos de búsqueda útiles y ha creado la oportunidad de utilizar anticuerpos como reactivos farmacéuticos aprobados en la terapia contra el cáncer, los trastornos autoinmunitarios, el rechazo de transplantes, la profilaxis antiviral y como antitrombóticos (Glennie y Johnson 2000). La aplicación de la ingeniería molecular para convertir mAb murinos en mAb quiméricos (región V de ratón, región C humana) y reactivos humanizados en los que solamente las regiones determinantes de la complementariedad del mAb (VDR) son de origen murino ha sido crítica para el éxito clínico de la terapia con mAb. Los mAb diseñados tienen una inmunogenicidad notablemente reducida o ausente, un incremento de la vida media en suero y la porción Fc humana de los mAb aumenta el potencial para reclutar los efectores inmunitarios del complemento y las células citotóxicas (Clark 2000). Las investigaciones en la biodistribución, farmacocinética y cualquier inducción de una respuesta inmunitaria a los mAb administrados clínicamente requiere el desarrollo de análisis para discriminar entre las proteínas farmacéuticas y endógenas.

Los anticuerpos, o cualquiera de sus fragmentos, también se pueden conjugar o fusionar recombinantemente a cualquier toxina celular, bacteriana u otra, *p. ej.* exotoxina de pseudomonas, ricina, o toxina de la difteria. La parte de la toxina utilizada puede ser la toxina completa, o cualquier dominio concreto de la toxina. Tales moléculas de anticuerpo-toxina se han utilizado con éxito para la localización y terapia de diferentes clases de cánceres, véase *p. ej.* Pastan, *Biochim Biophys Acta*. 1997 Oct 24;1333(2):C1-6; Kreitman *et al.*, *N Engl J Med*. 2001 Jul 26;345(4):241-7; Schnell *et al.*, *Leukemia*. 2000 Jan;14(1):129-35; Ghetie *et al.*, *Mol Biotechnol*. 2001 Jul;18(3):251-68.

Se pueden formar multímeros bi- y tri-específicos por asociación de diferentes moléculas scFv y se han diseñado como reactivos de entrecruzamiento para el reclutamiento de células T en tumores (inmunoterapia), redireccionamiento viral (terapia génica) y como reactivos de aglutinación de glóbulos rojos (inmunodiagnóstico), véase *p. ej.* Todorovska *et al.*, *J Immunol Methods*. 2001 Feb 1;248(1-2):47-66; Tomlinson *et al.*, *Methods Enzymol*. 2000;326:461-79; McCall *et al.*, *J Immunol*. 2001 May 15;166(10):6112-7.

Los anticuerpos completamente humanos se pueden preparar inmunizando ratones transgénicos que portan grandes porciones de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina humana. Estos ratones, ejemplos de tales ratones son Xenomouse[®] (Abgenix, Inc.) (Patentes de los Estados Unidos Núms. 6.075.181 y 6.150.584), HuMAB-Mouse[®] (Medarex, Inc./GenPharm) (Patentes de los Estados Unidos 5545806 y 5569825), TransChromo Mouse[®] (Kirin) y KM Mouse[®] (Medarex/Kirin), son bien conocidos en la técnica. Después se pueden preparar anticuerpos, *p. ej.* mediante

técnicas de hibridoma convencionales o mediante presentación en fagos. Estos anticuerpos contendrán en ese caso solamente secuencias de aminoácidos completamente humanas.

También se pueden generar anticuerpos completamente humanos utilizando la presentación en fagos de genotecas humanas. La presentación en fagos se puede realizar utilizando métodos bien conocidos por el experto en la técnica, como los de Hoogenboom *et al* y Marks *et al* (Hoogenboom HR y Winter G. (1992) J Mol Biol. 227(2):381-8; Marks JD *et al* (1991) J Mol Biol. 222(3):581-97; y también las Patentes de los Estados Unidos 5885793 y 5969108).

Anticuerpos Terapéuticos y Usos

Las propiedades *in vivo*, concretamente con respecto a la razón tumor:sangre y a la velocidad de aclaramiento, de los miembros de unión específica de la invención serán como mínimo comparables con las de mAb806. Después de la administración a un sujeto animal o humano semejante miembro de unión específica mostrará una razón de tumor con respecto a sangre máxima de > 1:1. Preferiblemente a dicha razón el miembro de unión específica también tendrá una razón de tumor con respecto a órgano de más de 1:1, preferiblemente más de 2:1, más preferiblemente más de 5:1. Preferiblemente a semejante razón el miembro de unión específica también tendrá una razón de órgano con respecto a sangre de < 1:1 en los órganos alejados del sitio del tumor. Estas razones excluyen los órganos de catabolismo y secreción del miembro de unión específica administrado. De este modo en el caso de los scFv y los Fab (como se muestra en los ejemplos adjuntos), los miembros de unión se excretan por los riñones y hay una mayor presencia aquí que en otros órganos. En el caso de las IgG completas, el aclaramiento será al menos en parte, por el hígado. La razón de localización máxima del anticuerpo intacto se alcanzará normalmente entre 10 y 200 horas después de la administración del miembro de unión específica. Más particularmente, la razón se puede medir en un xenoinjerto de tumor de aproximadamente 0,2 - 1,0 g formado subcutáneamente en un flanco de un ratón carente de sistema inmunitario atímico.

Los anticuerpos de la invención se pueden marcar con una marca detectable o funcional. Las marcas detectables incluyen, pero no están limitadas a, marcas radiactivas tales como los isótopos H³, C¹⁴, P³², S³⁵, Cl³⁶, Cr⁵¹, Co⁵⁷, Co⁵⁸, Fe⁵⁹, Y⁹⁰, I¹²¹, I¹²⁴, I¹²⁵, I¹³¹, In¹¹¹, At²¹¹, Au¹⁹⁸, Cu⁶⁷, Ac²²⁵, Bi²¹³, Tc⁹⁹ y Re¹⁸⁶, que pueden ser ancladas a los anticuerpos de la invención utilizando la química convencional conocida en la técnica de formación de imágenes con anticuerpos. Las marcas también incluyen marcas fluorescentes y marcas utilizadas convencionalmente en la técnica para formar imágenes por MRI-CT. También incluyen marcas enzimáticas tales como peroxidasa de rábano picante. Las marcas incluyen adicionalmente radicales químicos tales como biotina que pueden ser detectadas por la unión a un radical detectable cognado específico, *p. ej.* avidina marcada.

Las marcas funcionales incluyen sustancias que se diseñan para ser dirigidas al sitio del tumor para causar la destrucción del tejido tumoral. Tales marcas funcionales incluyen fármacos citotóxicos tales como 5-fluorouracilo o ricina y enzimas tales como carboxipeptidasa bacteriana o nitrorreductasa, que son capaces de convertir los profármacos en fármacos activos en el sitio del tumor.

Asimismo, los anticuerpos que incluyen anticuerpos tanto policlonales como monoclonales, y los fármacos que modulan la producción o actividad de los miembros de unión específica, los anticuerpos y/o sus subunidades poseen ciertas aplicaciones diagnósticas y se pueden utilizar, por ejemplo, con el fin de detectar y/o medir los estados tales como el cáncer, las lesiones precancerosas, los estados relacionados con o resultantes del crecimiento celular hiperproliferativo o similar. Por ejemplo, los miembros de unión específica, anticuerpos o sus subunidades se pueden utilizar para producir anticuerpos tanto policlonales como monoclonales para ellos mismos en una variedad de medios celulares, mediante mecanismos conocidos tales la técnica del hibridoma que utiliza, por ejemplo, linfocitos de bazo de ratón y células de mieloma fusionados. Del mismo modo, se pueden descubrir o sintetizar pequeñas moléculas que imitan o tienen un efecto antagónico sobre la actividad o las actividades de los miembros de unión específica de la invención, y se pueden utilizar en protocolos diagnósticos y/o terapéuticos.

Los miembros de unión específica radiomarcados, concretamente anticuerpos y sus fragmentos, son útiles en técnicas diagnósticas *in vitro* y técnicas con radioimágenes *in vivo* y en inmunoterapia. En el caso de las imágenes *in vivo*, los miembros de unión específica de la presente invención se pueden conjugar con un agente para la formación de imágenes en lugar de uno o varios radioisótopos, incluyendo pero no limitados a un agente potenciador de imágenes por resonancia magnética, donde una molécula de anticuerpo se carga, por ejemplo, con un gran número de iones paramagnéticos a través de grupos quelantes. Los ejemplos de los grupos quelantes incluyen EDTA, porfirinas, éteres corona de poliaminas y polioximas. Los ejemplos de los iones paramagnéticos incluyen gadolinio, hierro, manganeso, renio, europio, lantano, holmio y ferbio. En un aspecto adicional de la invención, los miembros de unión específica radiomarcados, concretamente los anticuerpos y sus fragmentos, concretamente radioinmunoconjugados, son útiles en radioinmunoterapia, particularmente como anticuerpos radiomarcados para la terapia del cáncer. En un aspecto adicional, los miembros de unión específica radiomarcados, particularmente anticuerpos y sus fragmentos, son útiles en las técnicas de cirugía radioinmuno-guiada, donde pueden identificar e indicar la presencia y/o localización de células cancerosas, células precancerosas, células tumorales, y células hiperproliferativas, antes, durante o después de la cirugía para eliminar tales células.

Los inmunoconjugados o las proteínas de fusión con anticuerpos de la presente invención, donde los miembros de unión específica, concretamente anticuerpos y sus fragmentos, de la presente invención están conjugados o anclados a otras moléculas o agentes incluyen adicionalmente, pero no están limitados a miembros de unión conjugados a

un agente de ablación química, toxina, inmunomodulador, citoquina, agente citotóxico, agente quimioterapéutico o fármaco.

La radioinmunoterapia (RAIT) ha entrado en la clínica y ha demostrado eficacia utilizando diferentes inmunocombinados con anticuerpos. El anticuerpo anti-antígeno carcinoembrionario (anti-CEA) humanizado marcado con I^{131} hMN-14 ha sido evaluado en cáncer colorrectal (Behr TM *et al* (2002) *Cancer* 94(4Suppl):1373-81) y el mismo anticuerpo con una marca de Y^{90} ha sido evaluado en carcinoma medular de tiroides (Stein R *et al* (2002) *Cancer* 94(1):51-61). También se ha evaluado y se ha dado cuenta de la radioinmunoterapia utilizando anticuerpos monoclonales para linfoma no Hodgkin y cáncer pancreático (Goldenberg DM (2001) *Crit Rev Oncol Hematol* 39(1-2):195-201; Gold DV *et al* (2001) *Crit Rev Oncol Hematol* 39 (1-2) 147-54). Los métodos de radioinmunoterapia con anticuerpos concretos también se describen en las Patentes de los Estados Unidos 6.306.393 y 6.331.175. La cirugía radioinmunoguiada (RIGS) también ha entrado en la clínica y se ha demostrado su eficacia y utilidad, incluyendo el uso de anticuerpos anti-CEA y anticuerpos dirigidos contra antígenos asociados a tumores (Kim JC *et al* (2002) *Int J Cancer* 97(4):542-7; Schneebaum S *et al* (2001) *World J Surg* 25(12):1495-8; Avital S *et al* (2000) *Cancer* 89(8):1692-8; McIntosh DG *et al* (1997) *Cancer Biother Radiopharm* 12 (4):287-94).

Los anticuerpos de la presente invención se pueden administrar a un paciente que necesita tratamiento por cualquier ruta adecuada, normalmente mediante inyección en la corriente sanguínea o el FCE, o directamente en el sitio del tumor. La dosis precisa dependerá de numerosos factores, incluyendo si el anticuerpo es para diagnóstico o para tratamiento, el tamaño y localización del tumor, la naturaleza exacta del anticuerpo (ya sea anticuerpo completo, fragmento, fragmento biespecífico, etc), y la naturaleza de la marca detectable o funcional anclada al anticuerpo. Cuando se utiliza un radionúclido para terapia, la dosis individual máxima adecuada es de aproximadamente 45 mCi/m², a un máximo de aproximadamente 250 mCi/m². La dosis preferible está en el intervalo de 15 a 40 mCi, con un intervalo de dosificación adicionalmente preferido de 20 a 30 mCi, o de 10 a 30 mCi. Semejante terapia puede requerir un trasplante de médula ósea o de células madre. Una dosis de anticuerpo típica para la formación de imágenes de un tumor o para el tratamiento de un tumor estará en el intervalo de 0,5 a 40 mg, preferiblemente de 1 a 4 mg de anticuerpo en forma F(ab')₂. Los anticuerpos desnudos se administran preferiblemente en dosis de 20 a 1000 mg de proteína por dosis, o de 20 a 500 mg de proteína por dosis, o de 20 a 100 mg de proteína por dosis. Esta es una dosis para un tratamiento individual de un paciente adulto, que puede ser ajustada proporcionalmente para niños o bebés, y también ajustada para otros formatos de anticuerpo en proporción con el peso molecular. Los tratamientos se pueden repetir a intervalos diarios, bi-semanales, semanales o mensuales, a discreción del médico.

Estas formulaciones pueden incluir una segunda proteína de unión, tales como las proteínas de unión a EGFR descritas *supra*. En una forma especialmente preferida, esta segunda proteína de unión es un anticuerpo monoclonal tal como 528 o 225, comentados *infra*.

Composiciones Farmacéuticas y Terapéuticas

Los miembros de unión específica de la presente invención se administrarán normalmente en forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además del miembro de unión específica.

De este modo las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, y para su uso de acuerdo con la presente invención, pueden comprender, además del ingrediente activo, un excipiente, portador, tampón, estabilizador u otras sustancias farmacéuticamente aceptables bien conocidas por los expertos en la técnica. Tales sustancias deben ser no tóxicas y no deben interferir en la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del portador u otro material dependerá de la ruta de administración, que puede ser oral, o mediante inyección, p. ej. intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas para la administración oral pueden estar en comprimidos, cápsulas, polvos o en forma líquida. Un comprimido puede comprender un portador sólido tal como gelatina o un coadyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente comprenden un portador líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceites minerales o aceite sintético. Se pueden incluir solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacárido o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

Para la inyección intravenosa, o la inyección en el sitio de la afección, el ingrediente activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógeno y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica relacionada son capaces de preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como Inyección de Cloruro de Sodio, Inyección de Solución de Ringer, Solución de Ringer con Lactato añadido. Se pueden incluir conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/o otros aditivos, según se requiera.

Se puede administrar una composición sola o combinada con otros tratamientos o agentes terapéuticos, ya sea simultáneamente o sucesivamente dependiendo de la afección que se vaya a tratar. Además, la presente invención contempla e incluye composiciones que comprenden el miembro de unión, concretamente un anticuerpo o uno de sus fragmentos, descrito en la presente memoria y otros agentes o terapéuticos tales como agentes anti-cancerosos o terapéuticos, hormonas, agentes o anticuerpos anti-EGFR, o moduladores inmunitarios. Más generalmente estos agentes anti-cancerosos pueden ser inhibidores de tirosina quinasa o inhibidores de la cascada de fosforilación, moduladores post-traduccionales, inhibidores del crecimiento o la división celular (p. ej. anti-mitóticos), o inhibidores de la transducción de la señal. Otros tratamientos o terapéuticos pueden incluir la administración de dosis adecuadas de fármacos

para aliviar el dolor tales como fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (*p. ej.* aspirina, paracetamol, ibuprofeno o cetoprofeno) u opiáceos tales como morfina, o antieméticos. La composición se puede administrar combinada (ya sea sucesivamente (esto es, antes o después) o simultáneamente) con inhibidores de tirosina quinasa (incluyendo, pero no limitados a AG1478 y ZD1839, STI571, OSI-774, SU-6668), doxorubicina, temozolomida, cisplatino, carboplatino, nitrosoureas, procarbazona, vincristina, hidroxurea, 5-fluoruracilo, citosinarabinósido, ciclofosfamida, epipodofilotoxina, carmustina, lomustina, y/o otros agentes quimioterapéuticos. De este modo, estos agentes pueden ser agentes específicos anti-EGFR, o inhibidores de la tirosina quinasa tales como AG1478, ZD1839, STI571, OSI-774, o SU-6668 o pueden ser agentes anti-cancerosos y anti-neoplásicos más generales tales como doxorubicina, cisplatino, temozolomida, nitrosoureas, procarbazona, vincristina, hidroxurea, 5-fluoruracilo, citosin-arabinosido, ciclofosfamida, epipodofilotoxina, carmustina, o lomustina. Además, la composición se puede administrar con hormonas tales como dexametasona, moduladores inmunitarios, tales como interleuquinas, factor de necrosis tumoral (TNF) u otros factores de crecimiento o citoquinas que estimulan la respuesta y la reducción o eliminación de células cancerosas o tumores. Un modulador inmunitario tal como el TNF se puede combinar con un miembro de la invención en forma de un anticuerpo biespecífico que reconoce el epítipo de EGFR 806 así como receptores del TNF. La composición también se puede administrar, o puede incluir combinaciones con otros anticuerpos anti-EGFR, incluyendo pero no limitados a los anticuerpos anti-EGFR 528, 225, SC-03, DR8.3, L8A4, Y10, ICR62 y ABX-EGF.

Previamente el uso de agentes tales como doxorubicina y cisplatino junto con anticuerpos anti-EGFR había producido una mejora de la actividad anti-tumoral (Fan *et al.*, 1993; Baselga *et al.*, 1993). La combinación de doxorubicina y mAb 528 dio como resultado la erradicación total de xenoinjertos A431, mientras el tratamiento con cualquier agente solo causaba únicamente una inhibición temporal del crecimiento *in vivo* (Baselga *et al.*, 1993). Del mismo modo, la combinación de cisplatino y cualquiera de mAb 528 o 225 también condujo a la erradicación de xenoinjertos A431 bien establecidos, que no se había observado al utilizar el tratamiento con cualquier agente (Fun *et al.*, 1993).

25 *Radioterapia Convencional*

Además, la presente invención contempla e incluye composiciones terapéuticas para el uso del miembro de unión combinado con radioterapia convencional. Se ha indicado que el tratamiento con anticuerpos dirigidos a los receptores de EGF puede aumentar los efectos de la radioterapia convencional (Milas *et al.*, Clin Cancer Res.2000 Feb:6 (2):701 8, Huang *et al.*, Clin Cancer Res. 2000 Jun: 6(6):2166 74).

Como se demuestra en la presente memoria, las combinaciones del miembro de unión de la presente invención, concretamente un anticuerpo o uno de sus fragmentos, preferiblemente mAb806, ch806 o uno de sus fragmentos, y agentes terapéuticos anti-cancerosos, concretamente agentes terapéuticos anti-EGFR, incluyendo otros anticuerpos anti-EGFR, demuestran una terapia eficaz, y concretamente sinergia, frente a tumores xenoinjertados. En los ejemplos, se demuestra que la combinación de AG 1478 y mAb 806 da como resultado un aumento significativo de la reducción del volumen de tumores por xenoinjerto A431 en comparación con el tratamiento con cualquier agente solo. AG 1478 (4-(3-cloroanilino)-6,7-dimetoxiquinazolina) es un inhibidor potente y selectivo de la quinasa receptora de EGF y se describe concretamente en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.457.105, (véase también, Liu, W. *et al.* (1999) J. Cell Sci. 112:2409; Eguchi, S. *et al.* (1998) J. Biol. Chem. 273:8890; Levitsky, A. y Gazit, A. (1995) Science 267:1782). Los ejemplos de la memoria demuestran adicionalmente sinergia del anticuerpo 806 con otros anticuerpos anti-EGFR, concretamente con el anticuerpo anti-EGFR 528.

La presente invención contempla adicionalmente composiciones terapéuticas útiles en la práctica de los métodos terapéuticos de la invención. Una composición terapéutica sujeto incluye, mezclados, un excipiente farmacéuticamente aceptable (portador) y uno o más de un miembro de unión específica, uno de sus análogos polipeptídicos o uno de sus fragmentos, como se describe en la presente memoria como ingrediente activo. En una realización preferida, la composición comprende un antígeno capaz de modular la unión específica del presente miembro de unión/anticuerpo con una célula diana.

La preparación de composiciones terapéuticas que contienen polipéptidos, análogos o fragmentos activos como ingredientes activos es bien conocida en la técnica. Típicamente, tales composiciones se preparan en forma de inyectables, en forma de soluciones o suspensiones líquidas. No obstante, también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para la disolución, o suspensión, en líquido antes de la inyección. La preparación también puede ser emulsionada. El ingrediente terapéutico activo se mezcla a menudo con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similar y sus combinaciones. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades minoritarias de sustancias coadyuvantes tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH que aumentan la eficacia del ingrediente activo.

Se puede formular un polipéptido, análogo o fragmento activo en la composición terapéutica en formas salinas farmacéuticamente aceptables neutralizadas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los tres grupos amino de la molécula de polipéptido o anticuerpo) y que están formadas con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, los ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas a partir de grupos carboxilo libres también se pueden obtener de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, calcio, o férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino-etanol, histidina, procaina, y similares.

ES 2 334 494 T3

Las composiciones que contienen el polipéptido, análogo, o fragmento activo terapéutico se administran convencionalmente intravenosamente, mediante inyección de una dosis unitaria, por ejemplo. El término “dosis unitaria” cuando se utiliza en referencia a una composición terapéutica de la presente invención hace referencia a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificación unitaria para seres humanos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado asociado con el diluyente requerido; esto es, portador, o vehículo.

Las composiciones se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad que se va a administrar depende del sujeto que se vaya a tratar, de la capacidad del sistema inmunitario del sujeto para utilizar el ingrediente activo, y del grado de capacidad de unión a EFGR deseado. Las cantidades exactas de ingrediente activo requeridas para ser administradas dependen del juicio del médico y son peculiares para cada individuo. Sin embargo, las dosificaciones adecuadas pueden oscilar de aproximadamente 0,1 a 20, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10, y más preferiblemente de uno a varios, miligramos de ingrediente activo por kilogramo de peso corporal del individuo por día y depende de la ruta de administración. Los regímenes adecuados para la administración inicial y las dosis de refuerzo también son variables, pero están tipificados por una administración inicial seguida de dosis repetidas a intervalos de una o más horas de una inyección u otra administración posterior. Alternativamente, se contempla la infusión intravenosa continua suficiente para mantener concentraciones de diez nanomolar a diez micromolar en sangre.

Las composiciones farmacéuticas para la administración oral pueden ser en forma de comprimidos, cápsulas, polvo o líquido. Un comprimido puede comprender un portador sólido tal como gelatina o un coadyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas comprenden generalmente un portador líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Se pueden incluir solución salina fisiológica, solución de dextrosa u otro sacárido o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

Para la inyección intravenosa, o la inyección en el lugar aquejado, el ingrediente activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógeno y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Aquellos con un conocimiento práctico de la técnica relevante son capaces de preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como Inyección de Cloruro de Sodio, Inyección de Solución de Ringer, Inyección de Solución de Ringer con Lactato añadido. Se pueden incluir conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/o otros aditivos, según se requiera.

Análisis Diagnósticos

La presente invención también hace referencia a una variedad de aplicaciones diagnósticas, incluyendo métodos para detectar la presencia de estímulos tales como el EGFR expresado aberrantemente, mediante la referencia a su capacidad para ser reconocido por el miembro de unión específica de la presente invención. Como se ha mencionado antes, se puede utilizar el EGFR para producir anticuerpos para sí mismo mediante una variedad de técnicas conocidas, y tales anticuerpos se podrían aislar y utilizar después en ensayos en busca de la presencia de una actividad concreta de EGFR en células diana sospechosas.

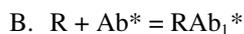
Las aplicaciones diagnósticas de los miembros de unión específica de la presente invención, concretamente anticuerpos y sus fragmentos, incluyen aplicaciones *in vitro* e *in vivo* bien conocidas y convencionales para los expertos en la técnica y basadas en la presente descripción. Los análisis y kits diagnósticos para la valoración y evaluación *in vitro* del estado de EGFR, concretamente con respecto a la expresión aberrante de EGFR, se pueden utilizar para diagnosticar, evaluar y controlar muestras de pacientes incluyendo aquellos que tienen o se sospecha que tienen, cáncer, una afección precancerosa, una afección relacionada con el crecimiento celular hiperproliferativo o una muestra de tumor. La valoración y evaluación del estado de EGFR también es útil para determinar la idoneidad de un paciente para una prueba clínica de un fármaco o para la administración de un agente quimioterapéutico o miembro de unión específica concreto, particularmente un anticuerpo, de la presente invención, incluyendo sus combinaciones, frente a un agente o miembro de unión diferente. Este tipo de control y evaluación diagnósticos ya se pone en práctica utilizando anticuerpos contra la proteína HER2 en el cáncer de mama (Hercep Test, Dako Corporation), donde el análisis también se utiliza para evaluar en pacientes la terapia con anticuerpo utilizando Herceptin. Las aplicaciones *in vivo* incluyen la formación de imágenes de tumores o la evaluación del estado del cáncer de los individuos, incluyendo la formación de radioimágenes.

Como se ha sugerido anteriormente, el método de la presente invención comprende examinar una muestra o medio celular mediante un análisis que incluye una cantidad eficaz de un antagonista para un EFGR/proteína, tal como un anticuerpo anti-EFGR, preferiblemente un anticuerpo policlonal purificado por afinidad, y más preferiblemente un mAb. Además, es preferible que las moléculas de anticuerpo anti-EFGR utilizadas en la presente memoria estén en forma de porciones Fab, Fab', F(ab')₂ o F(v) o de moléculas de anticuerpo completas. Como se ha comentado previamente, los pacientes susceptibles de beneficiarse de este método incluyen aquellos que padecen cáncer, una lesión pre-cancerosa, una infección viral, patologías que implican o resultan del crecimiento celular hiperproliferativo u otro trastorno patológico similar. Los métodos para aislar el EGFR e inducir anticuerpos anti-EFGR y para determinar y optimizar la capacidad de los anticuerpos anti-EFGR para ayudar al examen de las células diana son bien conocidos en la técnica.

Preferiblemente, el anticuerpo anti-EGFR utilizado en los métodos diagnósticos de esta invención es un anticuerpo policlonal purificado por afinidad. Más preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal (mAb). Además, las moléculas de anticuerpo anti-EGFR utilizadas en la presente memoria pueden estar en forma de porciones Fab, Fab', F(ab')₂ o F(v) de moléculas de anticuerpos completos.

Como se ha descrito con detalle antes, el anticuerpo o los anticuerpos para EGFR se pueden producir y aislar mediante métodos convencionales incluyendo las técnicas con hibridomas bien conocidas. Por conveniencia, el anticuerpo o los anticuerpos para EGFR serán referidos en la presente memoria como anticuerpo o anticuerpos Ab₁ originados en otra especie como Ab₂.

La presencia de EGFR en las células se puede averiguar mediante los procedimientos inmunológicos *in vitro* o *in vivo* habituales aplicables a tales determinaciones. Se conocen numerosos procedimientos útiles. Tres de estos procedimientos que son especialmente útiles emplean o EGFR marcado con una marca detectable, anticuerpo Ab₁ marcado con una marca detectable, o anticuerpo Ab₂ marcado con una marca detectable. Los procedimientos se pueden resumir por medio de las siguientes ecuaciones donde el asterisco indica que la partícula está marcada, y "R" representa el EGFR:



Los procedimientos y su aplicación son familiares para los expertos en la técnica y por consiguiente se pueden utilizar dentro del alcance de la presente invención. El procedimiento "competitivo", Procedimiento A, se describe en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 3.654.090 y 3.850.752. El procedimiento C, procedimiento "sándwich", se describe en las Patentes de los Estados Unidos Núms. RE 31.006 y 4.016.043. Se conocen otros procedimientos tales como el procedimiento del "anticuerpo doble" o "DASP".

En cada caso anterior, el EGFR forma complejos con uno o más anticuerpos o compañeros de unión y un miembro del complejo se marca con una marca detectable. El hecho de la formación del complejo, y si se desea, la cantidad del mismo, se pueden determinar mediante métodos conocidos aplicables a la detección de marcas.

A partir de lo anterior se observará, que una propiedad característica de Ab₂ es que éste reaccionará con Ab₁. Esto es porque se ha utilizado como antígeno un Ab₁ originado en una especie de mamífero en otra especie para originar el anticuerpo Ab₂. Por ejemplo, se puede originar Ab₂ en cabras utilizando anticuerpos de conejo como antígenos. Por lo tanto Ab₂ sería un anticuerpo-anti-conejo originado en cabras. Para los fines de esta descripción y de las reivindicaciones, Ab₁ será referido como anticuerpo primario o anti-EGFR, y Ab₂ será referido como anticuerpo secundario o anti-Ab₁. Las marcas más comúnmente empleadas para estos estudios son elementos radiactivos, enzimas, productos químicos que emiten fluorescencia cuando se exponen a la luz ultravioleta, y otros.

Se conocen y se pueden utilizar como marcas numerosos materiales fluorescentes. Estos incluyen, por ejemplo, fluoresceína, rodamina, auramina, Rojo Texas, azul AMCA y Amarillo Lucifer. Un material detector concreto es un anticuerpo anti-conejo preparado en cabras y conjugado con fluoresceína a través de un isotiocianato.

El EGFR o su compañero o compañeros de unión tales como el miembro de unión específica presente, también pueden ser marcados con un elemento radiactivo o con una enzima. La marca radiactiva puede ser detectada mediante cualquier procedimiento de recuento disponible actualmente. El isótopo se puede seleccionar entre H³, C¹⁴, P³², S³⁵, Cl³⁶, Cr⁵¹, Co⁵⁷, Co⁵⁸, Fe⁵⁹, Y⁹⁰, I¹²¹, I¹²⁴, I¹²⁵, I¹³¹, In¹¹¹, At²¹¹, Au¹⁹⁸, Cu⁶⁷, Ac²²⁵, Bi²¹³, Tc⁹⁹ y Re¹⁸⁶.

Del mismo modo son útiles las marcas enzimáticas, y se pueden detectar mediante cualquiera de las técnicas colorimétricas, espectrofotométricas, fluoroespectro-fotométricas, amperométricas o gasométricas utilizadas en la actualidad. La enzima se conjuga con la partícula seleccionada mediante reacción con moléculas formadoras de puentes tales como carbodiimidas, diisocianatos, glutaraldehído y similares. Se conocen y se pueden utilizar muchas enzimas que se pueden utilizar en estos procedimientos. Se prefieren peroxidasa, β-glucuronidasa, β-D-glucosidasa, β-D-galactosidasa, ureasa, glucosa oxidasa más peroxidasa y fosfatasa alcalina. Se hace referencia a las Patentes de los Estados Unidos Núm. 3.654.090; 3.850.752; y 4.016.043 a modo de ejemplo por su descripción de materiales y métodos de marcaje alternativos.

Un sistema de análisis concreto que se puede utilizar ventajosamente de acuerdo con la presente invención, es conocido como análisis de receptores. En un análisis de receptores, el material que se va a analizar tal como el miembro de unión específica, es marcado apropiadamente y después ciertas colonias de ensayo celular son inoculadas con una cantidad de material marcado y no marcado después de lo cual se realizan estudios de unión para determinar el grado en el cual se une el material marcado a los receptores celulares. De este modo, se pueden averiguar las diferencias de afinidad entre los materiales.

Por consiguiente, se puede marcar radiactivamente y combinar una cantidad purificada del miembro de unión específica, por ejemplo, con anticuerpos u otros inhibidores de estos, después de lo cual se llevarían a cabo estudios de

unión. Luego se prepararían soluciones que contuvieran diferentes cantidades de miembros de unión específica marcado y no marcado combinados, y después se inocularían muestras de células y a partir de ese momento se incubarían. Las monocapas de células resultantes se lavan después, se solubilizan y luego se someten a recuento en un contador gamma durante un lapso de tiempo suficiente para producir un error estándar de <5%. Estos datos se someten después a análisis Scatchard después de lo cual se pueden hacer observaciones y sacar conclusiones referentes a la actividad del material. Si bien lo anterior es ilustrativo, ilustra el modo en el que se puede realizar y utilizar un análisis de receptores, en el caso en el que la capacidad de unión celular del material analizado pueda servir como característica distintiva.

Un análisis útil y contemplado de acuerdo con la presente invención es conocido como análisis "cis/trans". En resumen, en este análisis se emplean dos constructos genéticos, uno de los cuales es típicamente un plásmido que expresa continuamente un receptor concreto de interés cuando es transfectado a una línea celular apropiada, y el segundo de los cuales es un plásmido que expresa un informador tal como luciferasa, bajo el control de un complejo receptor/ligando. De este modo, por ejemplo, si se desea evaluar un compuesto como ligando para un receptor concreto, uno de los plásmidos sería un constructo que diera como resultado la expresión del receptor en la línea celular seleccionada, mientras el segundo plásmido poseería un promotor ligado al gen de la luciferasa en el que estaría insertado el elemento de respuesta al receptor concreto. Si el compuesto que se va a someter a ensayo es un agonista del receptor, el ligando formará complejo con el receptor, y el complejo resultante se unirá al elemento de respuesta e iniciará la transcripción del gen de la luciferasa. La quimioluminiscencia resultante se mide después fotométricamente, y se obtienen curvas dosis-respuesta y se comparan con las de ligandos conocidos. El protocolo anterior se describe con detalle en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.981.784 y en la Publicación Internacional PCT Núm. WO 88/03168, para cuyo propósito se refiere al experto en la técnica.

En una realización adicional de esta invención, se pueden preparar kits de ensayo comerciales adecuados para su uso por un especialista médico para determinar la presencia o ausencia de la expresión aberrante de EGFR, incluyendo pero no limitado a EGFR amplificado y/o una mutación de EGFR, en células diana sospechosas. De acuerdo con las técnicas de ensayo descritas antes, una clase de tales kits contendrá al menos el EGFR marcado o su compañero de unión, por ejemplo un anticuerpo específico para esto, e indicaciones, por supuesto, dependiendo del método seleccionado, p. ej., "competitivo," "sándwich," "DASP" y similares. Los kits también pueden contener reactivos periféricos tales como tampones, estabilizadores, etc.

Por consiguiente, se puede preparar un kit de ensayo para demostrar la presencia o capacidad de las células de expresar aberrantemente o modificar post-traduccionamente el EGFR, que comprende:

- (a) una cantidad predeterminada de al menos un componente marcado inmunoquímicamente obtenido mediante anclaje directo o indirecto del presente miembro de unión específica o un compañero de unión específica para este, a una marca detectable;
- (b) otros reactivos; e
- (c) instrucciones para el uso de dicho kit.

Más específicamente, el kit de ensayo diagnóstico puede comprender:

- (a) una cantidad conocida del miembro de unión específica como se ha descrito antes (o un compañero de unión) generalmente unido a una fase sólida para formar un inmunoabsorbente, o como alternativa, unido a una etiqueta adecuada, o varios de tales productos finales, etc. (o sus compañeros de unión) uno de cada;
- (b) si fuera necesario, otros reactivos; y
- (c) instrucciones para el uso de dicho kit de ensayo.

En una variación adicional, el kit de ensayo se puede preparar y utilizar para los fines establecidos antes, que funciona de acuerdo con un protocolo predeterminado (p. ej. "competitivo," "sándwich," "doble anticuerpo," etc.), y comprende:

- (a) un componente marcado que ha sido obtenido acoplando el miembro de unión específica a una marca detectable;
- (b) uno o más reactivos inmunoquímicos adicionales de los cuales al menos un reactivo es un ligando o un ligando inmovilizado, cuyo ligando se selecciona del grupo que consiste en:
 - (i) un ligando capaz de unirse con el componente marcado (a);
 - (ii) un ligando capaz de unirse con un compañero de unión del componente marcado (a);

- (iii) un ligando capaz de unirse con al menos uno de los componentes que se va a determinar; y
- (iv) un ligando capaz de unirse con al menos uno de los compañeros de unión de al menos uno de los componentes que se van a determinar; y

5

(c) instrucciones para el funcionamiento de un protocolo para la detección y/o determinación de uno o más componentes de una reacción inmunológica entre el EFGR, el miembro de unión específica, y un compañero de unión específico para este.

10

De acuerdo con lo anterior, se pueden preparar un sistema de análisis para escrutar fármacos potenciales eficaces para modular la actividad del EFGR, la expresión aberrante o la modificación post-traduccional del EGFR, y/o la actividad o unión del miembro de unión específica. El receptor o el miembro de unión pueden ser introducidos en un sistema de ensayo, y el futuro fármaco también puede ser introducido en el cultivo celular resultante, y después de eso el cultivo se examina para observar cualquier cambio en la actividad en la fase S de las células, debida a la adición del futuro fármaco solo, o debido al efecto de las cantidades añadidas del agente o los agentes conocidos.

15

Ácidos Nucleicos

20

La presente invención proporciona adicionalmente un ácido nucleico aislado que codifica un miembro de unión específica de la presente invención. El ácido nucleico incluye ADN y ARN. En un aspecto preferido, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención como se ha definido antes, incluyendo un polipéptido que se expone como restos 115-123 del SEQ ID NO: 2 o 44-54, 68-83 y 115-123 del SEQ ID NO: 2, un polipéptido que se expone como restos 44-54, 70-76 y 109-117 del SEQ ID NO: 4, y los polipéptidos completos del SEQ ID NO: 2 y el SEQ ID NO: 4.

25

La presente invención también proporciona constructos en forma de plásmidos, vectores, casotes de transcripción o expresión que comprende al menos un polinucleótido como antes.

30

La presente invención también proporciona una célula anfitriona recombinante que comprende uno o más constructos como antes. Un ácido nucleico que codifica cualquier miembro de unión específica proporcionado como tal forma un aspecto de la presente invención, como lo hace el método de producción del miembro de unión específica cuyo método comprende la expresión a partir del ácido nucleico codificante del mismo. La expresión se puede lograr convenientemente mediante el cultivo en condiciones apropiadas de células anfitrionas recombinantes que contienen el ácido nucleico. Tras la producción mediante expresión se puede aislar y/o purificar un miembro de unión específica utilizando cualquier técnica adecuada, después se utiliza como sea apropiado.

35

Los miembros de unión específica y las moléculas de ácido nucleico codificante y los vectores de acuerdo con la presente invención se pueden proporcionar aislados y/o purificados, p. ej. de su entorno natural, en una forma esencialmente pura u homogénea, o, en el caso del ácido nucleico, libre o esencialmente libre de ácido nucleico o genes con un origen distinto de la secuencia que codifica un polipéptido con la función requerida. El ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede comprender ADN o ARN y puede ser total o parcialmente sintético.

40

Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de células anfitrionas diferentes son bien conocidos. Las células anfitrionas adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, levaduras y sistemas de baculovirus. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster Chino, células HeLa, células de riñón de cría de hámster, células de melanoma de ratón NSO y otras muchas. Un anfitrión bacteriano preferido, común es *E. coli*.

45

La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos en células procarióticas tales como *E. coli* está bien establecida en la técnica. Para una revisión, véase por ejemplo Plückthun, A. *Bio/Technology* 9: 545-551 (1991). La expresión en células eucarióticas en cultivo también se encuentra disponible para los expertos en la técnica como opción para la producción de un miembro de unión específica, para revisiones recientes véase, por ejemplo Raff, M:E. (1993) *Curr. Opinion Biotech.* 4: 573-576; Trill J.J. *et al.* (1995) *Curr. Opinion Biotech* 6: 553-560.

55

Se pueden elegir o construir vectores adecuados, que contienen secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias intensificadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos, virales p. ej. fagos o fagémidos, según sea apropiado. Para detalles adicionales véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 2ª edición, Sambrook *et al.* 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo en la preparación de constructos de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen con detalle en *Short Protocols in Molecular Biology*, Segunda Edición, Ausubel *et al.* eds., John Wiley & Sons, 1992.

60

De este modo, un aspecto adicional de la presente invención proporciona una célula anfitriona que contiene un ácido nucleico como se describe en la presente memoria. Un aspecto adicional más proporciona un método que comprende introducir semejante ácido nucleico en una célula anfitriona. En la introducción se puede emplear cualquier

65

ES 2 334 494 T3

técnica adecuada. Para las células eucarióticas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato de calcio, DEAE-Dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción utilizando retrovirus u otros virus, p. ej. vaccinia o, para células de insecto, baculovirus. Para las células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación con cloruro de calcio, electroporación y transfección utilizando bacteriófagos.

La introducción puede causar o permitir después la expresión a partir del ácido nucleico, p. ej. cultivando células anfitrionas en las condiciones para la expresión del gen.

En una realización, el ácido nucleico de la invención se integra en el genoma (p. ej. cromosoma) de la célula anfitriona. La integración puede ser promovida por la inclusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas convencionales.

La presente invención también proporciona un método que comprende utilizar un constructo como se ha establecido antes en un sistema de expresión con el fin de expresar un miembro de unión específica o polipéptido como antes.

Como se ha establecido antes, la presente invención también hace referencia a una molécula de ADN recombinante o un gen clonado, o una de sus variantes degeneradas, que codifica un miembro de unión específica, concretamente un anticuerpo o uno de sus fragmentos, que posee una secuencia de aminoácidos expuesta en el SEQ ID NO: 2 y/o el SEQ ID NO: 4; preferiblemente una molécula de ácido nucleico, en particular una molécula de ADN recombinante o un gen clonado, que codifica el miembro de unión o anticuerpo tiene una secuencia de nucleótido o es complementaria a una secuencia de ADN proporcionada en el SEQ ID NO: 1 y/o el SEQ ID NO: 3.

Otro rasgo de esta invención es la expresión de las secuencias de ADN descritas en la presente memoria. Como es bien sabido en la técnica, las secuencias de ADN pueden ser expresadas conectándolas operativamente a una secuencia para el control de la expresión en un vector de expresión apropiado y empleando ese vector de expresión para transformar un anfitrión unicelular apropiado.

Semejante conexión operativa de una secuencia de ADN de esta invención a una secuencia de control de la expresión, por supuesto, incluye, si no forma parte ya de la secuencia de ADN, la provisión de un codón de iniciación, ATG, en el marco de lectura correcto aguas arriba de la secuencia de ADN.

Se puede emplear una amplia variedad de combinaciones de anfitrión/vector de expresión al expresar las secuencias de ADN de esta invención. Los vectores de expresión útiles, por ejemplo, pueden consistir en segmentos cromosómicos, no cromosómicos y secuencias sintéticas de ADN. Los vectores adecuados incluyen derivados de SV40 y plásmidos bacterianos conocidos, p. ej., los plásmidos de *E. coli* col E1, pCR1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos tales como RP4; ADN de fagos, p. ej., los numerosos derivados del fago λ , p. ej., NM989, y otros ADN de fagos, p. ej., ADN de M13 y de fagos de hebra sencilla filamentosos; plásmidos de levaduras tales el plásmido 2u o sus derivados; vectores útiles en células eucarióticas, tales como vectores útiles en células de insecto o mamífero; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos, tales como plásmidos que han sido modificados para emplear ADN de fagos u otras secuencias de control de la expresión; y similares.

Se puede utilizar cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de la expresión - secuencias que controlan la expresión de una secuencia de ADN conectada operativamente a ella - en estos vectores para expresar las secuencias de ADN de esta invención. Tales secuencias de control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores temprano y tardío de SV40, CMV, vaccinia, polioma o adenovirus, el sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema *TAC*, el sistema *TRC*, el sistema *LTR*, las regiones operadora y promotora principales del fago λ , las regiones de control de la proteína de la envoltura fd, el promotor para la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida (p. ej., Pho5), los promotores de los factores de emparejamiento de levadura, y otras secuencias que se sabe que controlan la expresión de genes de células procarióticas o eucarióticas o sus virus, y sus diferentes combinaciones.

También son útiles una amplia variedad de células anfitrionas unicelulares en la expresión de las secuencias de ADN de esta invención. Estos anfitriones pueden incluir anfitriones eucarióticos y procarióticos bien conocidos, tales como cepas de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, hongos tales como levaduras, y células animales, tales como células CHO, YB/20, NSO, SP2/0, R1.1, B-W y L-M, células de riñón de Mono verde Africano (p. ej., COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, y BMT10), células de insecto (p. ej., Sf9), y células humanas y células vegetales en cultivos de tejidos.

Se entenderá que no todos los vectores, secuencias de control de la expresión y anfitriones funcionarán igualmente bien para expresar las secuencias de ADN de esta invención. Ni todos los anfitriones funcionarán igualmente bien con el mismo sistema de expresión. Sin embargo, un experto en la técnica será capaz de seleccionar los vectores, las secuencias de control de la expresión, y los anfitriones apropiados sin una experimentación indebida para completar la expresión deseada son apartarse del alcance de esta invención. Por ejemplo, al seleccionar un vector, se debe considerar el anfitrión debido a que el vector debe funcionar en él. El número de copias del vector, la capacidad para controlar ese número de copias, y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tal como un marcador antibiótico, también se tendrá en consideración. Al seleccionar una secuencia de control de la expresión, se tendrán en consideración normalmente una variedad de factores. Estos incluyen, por ejemplo, la fuerza relativa del sistema, su

controlabilidad, y su compatibilidad con la secuencia de ADN o gen concreto que se van a expresar, particularmente en lo que se refiere a las estructuras secundarias potenciales. Los anfitriones unicelulares adecuados se seleccionarán considerando, *p. ej.*, su compatibilidad con el vector elegido, sus características de secreción, su capacidad para plegar las proteínas correctamente, y sus requerimientos de fermentación, así como la toxicidad para el anfitrión del producto codificado por las secuencias de ADN que se van a expresar, y la facilidad de purificación de los productos de expresión.

Considerando estos y otros factores un experto en la técnica será capaz de construir una variedad de combinaciones de vector/secuencia de control de la expresión/anfitrión que expresarán las secuencias de ADN de esta invención en la fermentación o en un cultivo animal a gran escala.

Adicionalmente se pretende que se puedan preparar análogos del miembro de unión específica a partir de las secuencias de nucleótidos del derivado del complejo/subunidad proteico en el alcance de la presente invención. Los análogos, tales como fragmentos, pueden ser producidos, por ejemplo, mediante digestión con pepsina del material del miembro de unión específica. Otros análogos, tales como las muteínas, pueden ser producidos mediante mutagénesis dirigida al sitio convencional de las secuencias que codifican el miembro de unión específica. Los análogos que muestran “actividad del miembro de unión específica” tales como las moléculas pequeñas, funcionen como promotores o como inhibidores, pueden ser identificados mediante análisis *in vivo* y/o *in vitro* conocidos.

Como se ha mencionado antes, se puede preparar una secuencia de ADN que codifica un miembro de unión específica sintéticamente en lugar de clonarlo. La secuencia de ADN puede ser diseñada con los codones apropiados para la secuencia de aminoácidos del miembro de unión específica. En general, se seleccionarán los codones preferidos para el anfitrión pretendido si la secuencia se va a utilizar para la expresión. La secuencia completa se ensambla a partir de oligonucleótidos solapantes preparados mediante métodos convencionales y se ensambla en una secuencia codificante completa. Véase, *p. ej.*, Edge, *Nature*, 292:756 (1981); Nambair *et al.*, *Science*, 223:1299 (1984); Jay *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 259:6311 (1984).

Las secuencias sintéticas de ADN permiten la construcción conveniente de genes que expresaran análogos del miembro de unión específica o “muteínas”. Alternativamente, se pueden elaborar ADN que codifican muteínas mediante mutagénesis dirigida al sitio de genes o ADNc de miembros de unión específica nativos, y se pueden elaborar muteínas directamente utilizando la síntesis de polipéptidos convencional.

Un método general para la incorporación específica del sitio de aminoácidos no naturales en las proteínas es descrito por Christopher J. Noren, Spencer J. Anthony-Cahill, Michael C. Griffith, Peter G. Schultz, *Science*, 244:182-188 (Abril 1989). Este método se puede utilizar para crear análogos con aminoácidos no naturales.

La presente invención se extiende a la preparación de oligonucleótidos antisentido y ribozimas que se pueden utilizar para interferir en la expresión del EGFR a nivel traduccional. Este enfoque utiliza ácidos nucleicos antisentido y ribozimas para bloquear la traducción de un ARNm específico, o bien enmascarando ese ARNm con un ácido nucleico antisentido o bien escindiéndolo con una ribozima.

Los ácidos nucleicos antisentido son moléculas de ADN o ARN que son complementarias a al menos una porción de una molécula de ARNm específica. (Véase Weintraub, 1990; Marcus-Sekura, 1988). En la célula, estos hibridan con ese ARNm, formando una molécula de doble hebra. La célula no traduce un ARNm en esta forma de doble hebra. Por lo tanto, los ácidos nucleicos antisentido interfieren en la expresión del ARNm a proteína. Los oligómeros de aproximadamente quince nucleótidos y las moléculas que hibridan con el codón de iniciación AUG serán particularmente eficaces, puesto que son fáciles de sintetizar y es probable que posean menos problemas que las moléculas más grandes cuando se introducen en la célula productora. Se han utilizado métodos antisentido para inhibir la expresión de muchos genes *in vitro* (Marcus-Sekura, 1988; Hambor *et al.*, 1988).

Las ribozimas son moléculas de ARN que poseen la capacidad para escindir específicamente otras moléculas de ARN de cadena sencilla de una manera en cierto modo análoga a las endonucleasas de resección del ADN. Las ribozimas fueron descubiertas a partir de la observación de que ciertos ARNm tienen la capacidad de escindir sus propios intrones. Modificando la secuencia de nucleótidos de estos ARN, los investigadores han podido diseñar moléculas que reconocen secuencias de nucleótidos específicas en una molécula de ARN y lo escinden (Cech, 1988). Debido a que son específicas de la secuencia, solamente son inactivados los ARNm con secuencias concretas.

Los investigadores han identificado dos tipos de ribozimas, de tipo *Tetrahymena* y de tipo “cabeza de martillo”. (Hasselhoff y Gerlach, 1988) Las ribozimas de tipo *Tetrahymena* reconocen secuencias de cuatro bases, mientras las de tipo “cabeza de martillo” reconocen secuencias de once a dieciocho bases. Cuanto más larga es la secuencia de reconocimiento, más probable es que exista exclusivamente en las especies de ARNm diana. Por lo tanto, las ribozimas de tipo cabeza de martillo son preferibles a las ribozimas de tipo *Tetrahymena* para inactivar una especie de ARNm específica, y las secuencias de reconocimiento de dieciocho bases son preferibles para secuencias de reconocimiento más cortas.

Las secuencias de ADN descritas en la presente memoria se pueden utilizar de este modo para preparar moléculas antisentido contra, y ribozimas que escinden ARNm para EGFR y sus ligandos.

La invención se puede comprender mejor mediante la referencia a los siguientes Ejemplos no limitantes, que se proporcionan como ilustrativos de la invención.

5 Ejemplo 1

Aislamiento de anticuerpos

Materiales

10

Líneas Celulares

Para los análisis de inmunización y especificidad, se utilizaron diferentes líneas celulares, nativas o transfectadas con el gen normal o de tipo salvaje "wtEGFR" o con el gen Δ EGFR que portaba una mutación por delección Δ 2-7: Línea celular de fibroblastos murinos NR6, NR6 Δ EGFR (transfectada con Δ EGFR) y NR6_{wtEGFR} (transfectada con wtEGFR), línea celular de glioblastoma humano U87MG (que expresaba bajos niveles de wtEGFR endógeno), U87MG_{wtEGFR} (transfectada con wtEGFR), U87MG Δ EGFR (transfectada con Δ EGFR), y línea celular de carcinoma de células escamosas humano A431 (que expresaba elevados niveles de wtEGFR)[38]. Las líneas celulares y las transfecciones se habían descrito previamente (Nishikawa R., *et al.* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91(16):7727-7731).

20

La línea celular de astrocitoma U87MG (20), que expresa endógenamente bajos niveles de wt EGFR, se infectó con un retrovirus que contenía de2-7 EGFR para producir la línea celular U87MG. Δ 2-7 (10). La línea celular transfectada U87MG.wtEGFR fue producida como describen Nagane *et al* 1996 (Cancer Res., 56: 5079-5086). Mientras las células U87MG expresan aproximadamente 1×10^5 EGFR, las células U87MG.wtEGFR expresan aproximadamente 1×10^6 EGFR, y de este modo imitan la situación observada con la amplificación génica.

25

Se obtuvieron células de carcinoma escamoso humano A431 de ATCC (Rockville, MD). Todas las líneas celulares se cultivaron en DMEM/F-12 con GlutaMAX[®] (Life Technologies, Melbourne, Australia) con un suplemento de FCS al 10% (CSL, Melbourne, Australia).

30

Reactivos

Se sintetizaron los péptidos de empalme únicos biotinilados (Biotina-LEEKKGNYVVTDH (SEQ ID NO: 5) y LEEKKGNYVVTDH-Biotina (SEQ ID NO: 6)) a partir de de2-7 EGFR mediante la química de Fmoc convencional y se determinó la pureza (>96%) mediante HPLC en fase inversa y análisis de espectro de masas (Auspep, Melbourne, Australia).

35

Anticuerpos utilizados en los estudios

Con el fin de comparar los descubrimientos de los autores de la presente invención con otros reactivos, se incluyeron mAb adicionales en los estudios de los autores de la presente invención. Estos reactivos fueron mAb 528 para wtEGFR (Sato, J.D. *et al.* (1983) Mol. Biol. Med. 1(5):511-529) y DH8.3, que fue generado contra un péptido sintético que abarcaba la secuencia de empalme de la mutación por delección Δ 2-7 EGFR. El anticuerpo DH8.3 (IgG1) ha sido descrito previamente (Hills *et al.*, 1995, Int. J. Cancer 63(4); 537-543) y fue obtenido tras la inmunización de ratones con el péptido de empalme único encontrado en de2-7 EGFR (16). El anticuerpo 528, que reconoce tanto el EGFR de2-7 como el de tipo salvaje, ha sido descrito previamente (21) y fue producido en Biological Production Facility (Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne) utilizando un hibridoma obtenido de ATCC HB-8509. SC-03 es un anticuerpo policlonal de conejo purificado por afinidad originado contra un péptido carboxi terminal de EGFR (Santa Cruz Biotechnology Inc.).

50

Generación de anticuerpos monoclonales

55

Se utilizó la línea de fibroblastos murinos NR6 Δ EGFR como inmunógeno. Se generaron hibridomas de ratón inmunizando ratones BALB/c cinco veces subcutáneamente a intervalos de 2-3 semanas, con 5×10^5 - 2×10^6 células en coadyuvante. Se utilizó coadyuvante completo de Freund para la primera inyección. Después de eso, se utilizó coadyuvante incompleto de Freund (Difco). Se fusionaron células de bazo de ratones inmunizados con la línea celular de mieloma de ratón SP2/0. Los sobrenadantes de los clones recién generados se escrutaron en análisis de hemadsorción en busca de reactividad con la línea celular NR6, NR6_{wtEGFR}, y NR6 Δ EGFR y después se analizaron mediante análisis de hemadsorción con líneas celulares de glioblastoma humano U87MG, U87MG_{wtEGFR}, y U87MG Δ EGFR. Los sobrenadantes de hibridoma seleccionados se sometieron a ensayo con posterioridad mediante transferencia western y se analizaron adicionalmente mediante inmunohistoquímica. Los mAb recién generados que mostraban el patrón de reactividad esperado se purificaron.

65

Se establecieron cinco hibridomas y se seleccionaron tres clones 124 (IgG2a), 806 (IgG2b) y 1133 (IgG2a) para la caracterización adicional basándose en el elevado título con NR6 Δ EGFR y el bajo fondo en células NR6 y NR6_{wtEGFR} en el

ES 2 334 494 T3

análisis de hemaglutinación. En un análisis de hemaglutinación posterior, estos anticuerpos no mostraron reactividad (sobrenadante no diluido $\leq 10\%$) con la línea celular de glioblastoma humano nativo U87MG y U87MG_{wEGFR}, pero eran fuertemente reactivos con U87MG_{ΔEGFR}; se observó menos reactividad con A431. En contraste, en el análisis FACS, 806 no fue reactivo con U87MG nativo y tiñó intensamente U87MG_{ΔEGFR} y en un grado menor U87MG_{wEGFR} indicando unión de 806 tanto a ΔEGFR como a wtEGFR (véase más abajo).

En los análisis de transferencia Western, los mAb 124, 806 y 1133 fueron analizados en busca de reactividad con wtEGFR y ΔEGFR. Los productos lisados con detergente fueron extraídos de NR6_{ΔEGFR}, U87MG_{ΔEGFR} así como de A431. Los tres mAb mostraron un patrón de reactividad similar con los productos lisados celulares que teñían tanto la proteína wtEGFR (170 kDa) y como ΔEGFR (140 kDa). Como reactivo de referencia, se utilizó mAb R.I conocido por ser reactivo con wtEGFR (Waterfield M.D. *et al.* (1982) J. Cell Biochem. 20(2):149-161) en lugar de mAb 528, que se sabe que no es reactivo en el análisis de transferencia western. Mab R.I mostró reactividad con wt y ΔEGFR. Los tres clones recientemente generados mostraron reactividad con ΔEGFR y menos intensa con wtEGFR. DH8.3 solamente era positivo en el producto lisado de U87MG_{ΔEGFR} y NR6_{ΔEGFR}.

El análisis inmunohistoquímico de los clones 124, 806, y 1133 así como de mAb 528 y mAb DH8.3 en tumores por xenoinjerto con U87MG, U87MG_{ΔEGFR}, y A431 se muestran en la Tabla 1. Todos los mAb mostraron una tinción del xenoinjerto U87MG_{ΔEGFR}. Solamente mAb 528 mostró una débil reactividad en el xenoinjerto con U87MG nativas. En los xenoinjertos por A431, mAb 528 mostró una reactividad homogénea fuerte. Los mAb 124, 806, y 1133 revelaron reactividad en su mayor parte con células localizadas basalmente del carcinoma de células escuamosas de A431 y no reaccionaron con las capas de células superiores o el componente queratinizante. DH8.3 fue negativo en xenoinjertos de A431.

TABLA 1

Análisis Inmunohistoquímico de Anticuerpos 528, DH8.3, y 124, 806 y 1133			
Mab	xenoinjerto AU87MG _{ΔEGFR}	xenoinjerto A431	xenoinjerto U87MG (nativa)
528	pos.	pos.	pos. (tinción focal)
mAb-124	pos.	pos. (predominantemente células basales)	-
mAb-806	pos.	pos. (predominantemente células basales)	-
mAb-1133	pos.	pos. (predominantemente células basales)	-
DH8.3	pos.	-	-
tinción estromal minoritaria debido a la detección de anticuerpos endógenos de ratón			

Ejemplo 2

Unión de anticuerpos a líneas celulares mediante FACS

5 Con el fin de determinar la especificidad de mAb 806, se analizó su unión a células U87MG, U87MG.Δ2-7 y U87MG.wtEGFR mediante clasificación de células por fluorescencia activada (FACS). Brevemente, se marcaron las células con el anticuerpo relevante (10 μg/ml) seguido de IgG anti-ratón de cabra conjugado con fluoresceína (dilución 1:100; Calbiochem San Diego, USA). Se obtuvieron datos de FACS sobre un Coulter Epics Elite ESP observando un mínimo de 5.000 eventos y se analizaron utilizando EXPO (versión 2) para Windows. Se incluyó una IgG2b irrelevante como control de isotipo para mAb 806 y se incluyó el anticuerpo 528 ya que reconoce tanto EGFR de2-7 como wt.

15 Solamente el anticuerpo 528 fue capaz de teñir la línea celular U87MG parental (Figura 1) coincidiendo con informes previos que demuestran que estas células expresan el wt EGFR (Nishikawa *et al.* 1994). MAb 806 y DH8.3 tuvieron niveles de unión similares al anticuerpo de control, demostrando claramente que no son capaces de unirse al receptor wt (Figura 1). La unión del anticuerpo de control del isotipo para las células U87MG.Δ2-7 y U87MG.wtEGFR fue similar a la observada para las células U37MG.

20 El mAb 806 tiñó las células U87MG.Δ2-7 y U87MG.wtEGFR, indicando que mAb 806 reconoce específicamente de2-7 EGFR y EGFR amplificado (Figura 1). El anticuerpo DH8.3 tiñó las células U87MG.Δ2-7, confirmando que el anticuerpo DH8.3 reconoce específicamente el de2-7 EGFR (Figura 1). Como se esperaba, el anticuerpo 528 tiñó tanto las líneas celulares U87MG.Δ2-7 como U87MG.wtEGFR (Figura 1). Como se esperaba, el anticuerpo 528 tiñó U87MG.Δ2-7 con una intensidad mayor que la célula parental puesto que se une a los receptores tanto de2-7 como de tipo salvaje que se expresados simultáneamente en estas células (Figura 1). Se obtuvieron resultados similares utilizando una hemadsorción mixta con proteína A que detecta la IgG unida a la superficie mediante la aparición de proteína A recubierta con glóbulos rojos humanos (grupo O) para las células diana. El anticuerpo monoclonal 806 fue reactivo con las células U87MG.Δ2-7 pero mostró una reactividad no significativa (sobrenadante no diluido menor del 10%) con U87MG que expresaban EGF-R de tipo salvaje.

30 Ejemplo 3

Unión de anticuerpos en análisis

35 Para caracterizar adicionalmente la especificidad de mAb 806 y el anticuerpo DH8.3, se examinó su unión mediante ELISA. Se utilizaron dos tipos de ELISA para determinar la especificidad de los anticuerpos. En el primer análisis, las placas se recubrieron con sEGFR (10 μg/ml en tampón carbonato 0,1 M pH 9,2) durante 2 h y después se bloquearon con albúmina de suero humano al 2% (HSA) en PBS. sEGFR es el dominio extracelular recombinante (aminoácidos 1-621) del EGFR de tipo salvaje, y fue producido como se ha descrito previamente (22). Se añadieron anticuerpos a los pocillos por triplicado a una concentración creciente en HSA al 2% en solución salina tamponada con fosfato (PBS). El anticuerpo unido se detectó mediante IgG anti-ratón de oveja conjugada con peroxidasa de rábano picante (Silenus, Melbourne, Australia) utilizando ABTS (Sigma, Sydney, Australia) como sustrato y se midió la absorbancia a 405 nm.

45 Tanto mAb 806 como el anticuerpo 528 presentaron curvas de unión dependientes de la dosis y saturantes para sEGFR de tipo salvaje inmovilizado (Figura 2A). Como el péptido de empalme único encontrado en de2-7 EGFR no está contenido en el sEGFR, el mAb 806 se debe estar uniendo a un epítipo localizado en la secuencia de EGFR de tipo salvaje. La unión del anticuerpo 528 fue inferior a la observada para mAb 806. Como se esperaba el anticuerpo DH8.3 no se unía al sEGFR de tipo salvaje ni siquiera a concentraciones de hasta 10 μg/ml (Figura 2A). Si bien el sEGFR en disolución inhibía la unión del anticuerpo 528 al sEGFR inmovilizado de una manera dependiente de la dosis, no era capaz de inhibir la unión de mAb 806 (Figura 2B). Esto sugiere que el mAb 806 sólo se puede unir al EGFR de tipo salvaje una vez inmovilizado sobre las placas de ELISA, un procedimiento que puede inducir cambios conformacionales. Se observaron resultados similares utilizando un BIAcore en el que el mAb 806 se unía a sEGFR inmovilizado pero el mAb 806 inmovilizado no era capaz de unirse a sEGFR en disolución (datos no mostrados). El anticuerpo DH8.3 mostró una unión dependiente de la dosis y saturable al péptido de2-7 EGFR único (Figura 2C).

60 En el segundo análisis, el péptido específico de2-7 biotinilado (Biotina-LEEKKGNYVVDH (SEQ ID NO: 5)) se unió a placas ELISA previamente recubiertas con estreptavidina (Pierce, Rockford, Illinois). Los anticuerpos se unieron y se detectaron como en el primer análisis. Ni mAb 806 ni el anticuerpo 528 se unían al péptido, ni siquiera a concentraciones superiores a las utilizadas para obtener una unión por saturación de DH8.3, indicando adicionalmente que mAb 806 no reconoce un determinante epítipo en este péptido.

65 Para demostrar adicionalmente que mAb 806 reconoce un epítipo distinto del péptido de empalme, se realizaron experimentos adicionales. El péptido de2-7 biotinilado C-terminal (LEEKKGNYVVDH-Biotina (SEQ ID NO: 6)) se utilizó en estudios con mAb806 y mAb L8A4, generados contra el péptido de2-7 (Reist, CJ *et al* (1995) Cancer Res. 55(19):4375-4382; Foulon CF *et al.* (2000) Cancer Res. 60(16):4453-4460).

ES 2 334 494 T3

Reactivos utilizados en los Estudios Peptídicos

Péptido de Empalme:

5 LEEKKGNYVVDH-OH (Biosource, Camarillo, CA);

Péptido C:

10 LEEKKGNYVVDH(K-Biot)-OH (Biosource, Camarillo, CA);

sEGFR:

15 dominio extracelular soluble recombinante derivado de células CHO (aa 1-621) del EGFR de tipo salvaje (LICR Melbourne);

mAb 806:

20 anticuerpo monoclonal de ratón, IgG_{2b} (LICR NYB);

mAb L8A4:

25 anticuerpo monoclonal de ratón, IgG₁ (Duke University);

mAb de control del isotipo de IgG₁;

30 mAb de control del isotipo de IgG_{2b}

Se inmovilizó el Péptido C sobre un chip microsensor de Estreptavidina a una densidad superficial de 350RU (+/- 30RU). Se sometieron a ensayo diluciones seriadas de mAb en busca de reactividad con el péptido. Se realizaron experimentos de bloqueo utilizando péptido no biotinilado para evaluar la especificidad.

El mAb L8A4 mostró una fuerte reactividad con el Péptido C incluso a bajas concentraciones de anticuerpo (6,25 nM) (Figura 2D). El mAb 806 no mostró una reactividad específica detectable con el péptido C hasta concentraciones de anticuerpo de 100 nM (concentración más alta sometida a ensayo) (Figuras 2D y 2E). Se esperaba que mAb L8A4 reaccionara con el Péptido C debido a que el péptido se utilizaba como inmunógeno en la generación de mAb L8A4. La adición del Péptido de Empalme (no biotinilado, 50 µg/ml) bloquea completamente la reactividad de mAb L8A4 con el Péptido C, confirmando la especificidad del anticuerpo por el epítipo del péptido de empalme.

En un segundo grupo de experimentos BIAcore, se inmovilizó sEGFR sobre un chip microsensor CM a una densidad superficial de -4000RU. Las diluciones seriadas de mAb se sometieron a ensayo en cuanto a su reactividad con sEGFR.

El mAb 806 era fuertemente reactivo con el sEGFR desnaturalizado mientras el mAb L8A4 no reaccionaba con el sEGFR desnaturalizado. La reactividad de mAb 806 con sEGFR desnaturalizado disminuye con las concentraciones de anticuerpo decrecientes. Se esperaba que mAb L8A4 no reaccionara con sEGFR debido a que el mAb L8A4 era generado utilizando el péptido de empalme como inmunógeno y sEGFR no contenía el péptido de empalme.

También se realizaron experimentos de tinción inmunitaria mediante transferencia puntual. Las diluciones seriadas de péptido se aplicaron en 0,5 µl sobre PVDF o membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con BSA en PBS al 2%, y después se sondearon con los anticuerpos 806, L8A4, DH8.3 y control. Los anticuerpos L8A4 y DH8.3 se unieron al péptido sobre las membranas (datos no mostrados). Mab806 no se unió al péptido a concentraciones en las que L8A4 mostraba claramente unión (datos no mostrados). Los anticuerpos de control también fueron negativos para la unión al péptido.

El mAb 806 se unió al wtEGFR en los productos lisados celulares después de la inmunotransferencia (resultados no mostrados). Esto es diferente de los resultados obtenidos con el anticuerpo DH8.3, que reaccionaba con de2-7 EGFR pero no con wtEGFR. De este modo, mAb 806 puede reconocer el wtEGFR después de la desnaturalización pero no cuando el receptor está en su estado natural sobre la superficie de la célula.

65

Ejemplo 4

Análisis de Scatchard

5 Se realizó un análisis de Scatchard utilizando células U87MG.Δ2-7 siguiente a la corrección para la inmunorreactividad con el fin de determinar la afinidad relativa de cada anticuerpo. Los anticuerpos se marcaron con I¹²⁵ (Amrad, Melbourne, Australia) mediante el método de la cloramina T y se determinó la inmunorreactividad mediante análisis de Lindmo (23). Todos los análisis de unión se realizaron en HSA/PBS al 1% en 1-2 x 10⁶ células U87MG.Δ2-7 o A431 vivas durante 90 minutos a 4°C con rotación suave. Se utilizó una concentración ajustada de 10 ng/ml de anticuerpo marcado con I¹²⁵ en presencia de concentraciones crecientes del anticuerpo no marcado apropiado. Se determinó la unión no específica en presencia de un exceso de 10.000 veces de anticuerpo no marcado. Una vez que se hubo completado la incubación, las células se lavaron y se sometió a recuento el anticuerpo marcado con I¹²⁵ unido utilizando un contador gamma COBRA II (Packard Instrument Company, Meriden, EEUU).

15 Tanto mAb 806 como el anticuerpo DH8.3 conservaban una elevada inmunorreactividad cuando se yodaban y era típicamente mayor del 90% para mAb 806 y del 45-50% para el anticuerpo DH8.3. mAb 806 tenía una afinidad para el receptor de 2-7 EGFR de 1,1 x 10⁹ M⁻¹ mientras la afinidad de DH8.3 era 10 veces menor a 1,0 x 10⁸ M⁻¹. Ni el mAb 806 radiomarcado con I¹²⁵ ni el anticuerpo DH8.3 radiomarcado con I¹²⁵ se unían a las células U87MG parentales. El mAb 806 reconocía una media de 2,4 x 10⁵ sitios de unión por célula uniéndose el anticuerpo DH8.3 a una media de 5,2 x 10⁵ sitios. De este modo, sólo hubo una coincidencia en el número de receptores entre los anticuerpos, pero mostrando también un informe previo 2,5 x 10⁵ receptores de 2-7 por célula medido mediante un anticuerpo específico de 2-7 EGFR diferente en la misma línea celular (25).

Ejemplo 5

25 *Internalización de anticuerpos por células U87MG.Δ2-7*

La tasa de internalización de anticuerpo siguiente a la unión a una célula diana influye tanto en sus propiedades de localización de un tumor como en sus opciones terapéuticas. Por consiguiente, los autores examinaron la internalización de mAb 806 y del anticuerpo DH8.3 después de la unión a células U87MG.Δ2-7 por medio de FACS. Se incubaron las células U87MG.Δ2-7 con mAb 806 o con el anticuerpo DH8.3 (10 μg/ml) durante 1 hora en DMEM a 4°C. Después de lavar, las células se transfirieron a DMEM precalentado a 37°C y se tomaron alícuotas en diferentes momentos después de la incubación a 37°C. La internalización se detuvo lavando inmediatamente las alícuotas en tampón de lavado enfriado con hielo (HSA/PBS al 1%). Una vez completado el período de tiempo las células se tiñeron mediante FACS como se ha descrito antes. El porcentaje de internalización se calculó comparando la tinción del anticuerpo en superficie en diferentes momentos con el tiempo cero utilizando la fórmula: porcentaje de anticuerpo internalizado = (fluorescencia media en el momento x fluorescencia del fondo)/(fluorescencia media a tiempo 0 - fluorescencia del fondo) x 100. Este método fue validado en un análisis utilizando un anticuerpo yodado (mAb 806) para medir la internalización como se ha descrito previamente (24). Las diferencias en la tasa de internalización en diferentes momentos se compararon utilizando el test de la t de Student.

40 Ambos anticuerpos mostraron una internalización relativamente rápida alcanzando niveles de estado estacionario a los 10 min para mAb 806 y a los 30 min para DH8.3 (Figura 3). La internalización de DH8.3 fue significativamente mayor tanto en términos de tasa (80,5% de DH8.3 internalizado a los 10 min en comparación con 36,8% para mAb 806, p<0,01) y como en cantidad total internalizada a los 60 min (93,5% versus 30,4%, p<0,001). El mAb 806 mostró niveles significativamente inferiores de internalización a los 30 y 60 min en comparación con los 20 min en los 4 análisis realizados (Figura 3). Este resultado también se confirmó utilizando un análisis de internalización basado en el mAb 806 yodado.

Ejemplo 6

50 *Análisis de microscopía electrónica de la internalización de anticuerpos*

Dada la diferencia observada antes en las tasas de internalización entre los anticuerpos, se realizó un análisis detallado del tráfico intracelular de anticuerpos utilizando la microscopía electrónica.

55 Se hicieron crecer células U87MG.Δ2-7 desarrolladas sobre portas con cámaras recubiertas con gelatina (Nunc, Naperville, IL) a una confluencia del 80% y después se lavaron con DMEM enfriado con hielo. Después se incubaron las células con mAb 806 o con el anticuerpo DH8.3 en DMEM durante 45 min a 4°C. Después de lavar, las células se incubaron durante 30 min más con anti-IgG de ratón conjugado con oro (partículas de 20 nm) (BBInternational, Cardiff, UK) a 4°C. Después de un lavado adicional, se añadió DMEM/FCS al 10% a las células, que se incubaron a 37°C durante diferentes intervalos de 1-60 min. La internalización del anticuerpo se detuvo con medio enfriado con hielo y las células se fijaron con glutaraldehído al 2,5% en PBS/HSA al 0,1% y después se post-fijaron en tetróxido de osmio del 2,5%. Tras la deshidratación a través de una serie graduada de acetona, las muestras se embebieron en resina Epon/Araldite, se cortaron en forma de secciones ultrafinas con un microtomo Reichert Ultracut-S (Leica) y se recogieron sobre gradillas de níquel. Las secciones se tiñeron con acetato de uranio y citrato de plomo antes de ser visualizadas en un microscopio electrónico de transmisión Philips CM12 a 80 kV. Se realizó el análisis estadístico de los granos de oro contenidos en las fositas recubiertas utilizando un test de la Chi-cuadrado.

Si bien el anticuerpo DH8.3 era internalizado predominantemente por medio de las fositas recubiertas, el mAb 806 parecía ser internalizado mediante macropinocitosis (Figura 19). De hecho, un análisis detallado de 32 fositas recubiertas formadas en las células incubadas con mAb 806 reveló que ninguna de ellas contenía anticuerpo. En contraste, alrededor del 20% de todas las fositas recubiertas de las células incubadas con DH8.3 fueron positivas para el anticuerpo, conteniendo algunas múltiples granos de oro. Un análisis estadístico del número total de granos de oro contenidos en las fositas recubiertas descubrió que la diferencia era muy significativa ($p < 0,01$). Después de 20-30 min ambos anticuerpos podían ser observados en las estructuras que se asemejaban morfológicamente a lisosomas. La presencia de desechos celulares en estas estructuras también coincidía con su naturaleza lisosómica.

10 Ejemplo 7

Biodistribución de anticuerpos en ratones carentes de sistema inmunitario que portan tumores

15 Se comparó la biodistribución de mAb 806 y del anticuerpo DH8.3 en ratones carentes de sistema inmunitario que contenían xenoinjertos U87MG en un lado y xenoinjertos U87MG.Δ2-7 en el otro. Se seleccionó un período de tiempo relativamente corto para este estudio ya que un informe previo demostró que el anticuerpo DH8.3 muestra niveles máximos de localización de tumores entre 4-24 h (16).

20 Se establecieron xenoinjertos de tumores en ratones BALB/c carentes de sistema inmunitario mediante inyección s.c. de 3×10^6 células U87MG, U87MG.Δ2-7 o A431. La expresión de de2-7 EGFR en xenoinjertos U87MG.Δ2-7 permaneció estable durante todo el período de biodistribución. Asimismo, las células A431 conservaron su actividad mAb 806 cuando se hicieron crecer como xenoinjertos de tumor como se determina mediante inmunohistoquímica (datos no mostrados). Las células U87MG o A431 se inyectaron en un lado 7-10 días antes de que las células U87MG.Δ2-7 fueran inyectadas en el otro lado debido a la mayor velocidad de crecimiento observada para los xenoinjertos que expresaban de2-7 EGFR. Los anticuerpos fueron radiomarcados y evaluados en busca de inmunorreactividad como se ha descrito antes y fueron inyectados en los ratones por la ruta retro-orbital cuando los tumores pesaban 100-200 mg. Cada ratón recibió dos anticuerpos diferentes ($2 \mu\text{g}$ por anticuerpo): $2 \mu\text{Ci}$ de mAb 806 marcado con I^{125} y $2 \mu\text{Ci}$ de DH8.3 o 528 marcado con I^{131} . A no ser que se indique, se sacrificaron grupos de 5 ratones en diferentes momentos después de la inyección y se obtuvo sangre mediante punción cardíaca. Los tumores, hígado, bazo, riñones y pulmones se obtuvieron por disección. Todos los tejidos se pesaron y se analizaron en cuanto a su actividad I^{125} e I^{131} utilizando un Dual Channel Counting Window. Los datos fueron expresados para cada anticuerpo como % DI/g de tumor determinado comparando con patrones de dosis inyectados o convertidos en razones tumor/sangre/hígado (es decir, % DI/g de tumor dividido por % DI/g de sangre o hígado). Las diferencias entre los grupos se analizaron mediante el test de la t de Student.

35 En términos de % DI/g de tumor, el mAb 806 alcanzó su nivel máximo en xenoinjertos U87MG.Δ2-7 del 18,6% m/g de tumor a las 8 h (Figura 4A), considerablemente superior que en cualquier otro tejido excepto la sangre. Si bien DH 8.3 también mostró niveles de tumor máximos a las 8 h, el nivel fue estadísticamente ($p < 0,001$) inferior 8,8% m/g de tumor en comparación con mAb 806 (Figura 4B). Los niveles de ambos anticuerpos disminuían lentamente a las 24 y 48 h. Ningún anticuerpo mostró una localización específica de xenoinjertos U87MG parentales (Figura 4A,B). Con respecto a las razones de tumor con respecto a sangre/hígado, mAb 806 mostró la razón más alta a las 24 h tanto para sangre (razón de 1,3) como para hígado (razón de 6,1) (Figura 5A,B). El anticuerpo DH8.3 tuvo su razón más alta en sangre a las 8 h (razón de 0,38) y a las 24 h en hígado (razón de 1,5) (Figura 5 A,B), ambas las cuales son considerablemente inferiores a los valores obtenidos para mAb 806.

45 Como se ha descrito antes, los niveles de mAb 806 en el tumor mostraron picos a las 8 horas. Si bien este máximo es relativamente temprano comparado con muchos anticuerpos localizadores de tumores, es completamente coincidente con otros estudios utilizando anticuerpos específicos para de2-7 EGFR que muestran todos picos a las 4-24 horas de la inyección cuando se utiliza una dosis similar de anticuerpo (16, 25, 33). En efecto, a diferencia de los informes anteriores, el momento puntual de las 8 horas se incluyó en la suposición de que la localización por el anticuerpo alcanzaría un máximo rápidamente. El % DI/g de tumor observado con mAb 806 fue similar al referido para otros anticuerpos específicos de de2-7 EGFR cuando se utilizaban técnicas de yodación convencionales (16, 24, 32). La razón del máximo temprano es probablemente doble. En primer lugar, los tumores que expresan el de2-7 EGFR, incluyendo las células U87MG transfectadas, crecen extremadamente rápido como xenoinjertos tumorales. De este modo, incluso durante el período de tiempo relativamente corto utilizado en estos estudios de biodistribución, el tamaño del tumor aumenta hasta tal punto (incremento de 5-10 veces en la masa en 4 días) que el % DI/g de tumor se reduce en comparación con los tumores de crecimiento lento. En segundo lugar, si bien la internalización de mAb 806 fue relativamente lenta en comparación con DH8.3, ésta es todavía rápida con respecto a muchos otros sistemas anticuerpo/antígeno tumorales. Los anticuerpos internalizados experimentan una rápida proteólisis siendo excretados los productos de degradación de la célula (34). Este procedimiento de internalización, degradación y excreción reduce la cantidad de anticuerpo yodado retenida dentro de la célula. Por consiguiente, los anticuerpos internalizantes presentan niveles inferiores de localización que sus contrapartes no internalizantes. Los datos de la microscopía electrónica referidos en la presente memoria demuestran que el mAb 806 internalizado es transportado rápidamente a los lisosomas donde se produce presumiblemente la degradación rápida. Esta observación coincide con la rápida expulsión del yodo de la célula.

65 El anticuerpo monoclonal L8A4 descrito previamente dirigido al péptido de empalme único encontrado en de2-7 EGFR, se comporta de una manera similar al mAb 806 (35). Utilizando células U87MG transfectadas con de2-7 EGFR, este anticuerpo tuvo una tasa de internalización similar (35% a 1 hora en comparación con el 30% a 1 hora

ES 2 334 494 T3

para mAb 806) y presentó una localización *in vivo* comparable cuando se utilizaban fibroblastos 3T3 transfectados con de2-7 EGFR (pico de 24% DI/g de tumor a las 24 horas en comparación con 18% DI/g de tumor a las 8 horas para mAb 806) (25). De modo interesante, la retención *in vivo* de este anticuerpo en xenoinjertos de tumor aumentó cuando se marcó con 5-yodo-3-piridino-carboxilato de N-succinimidilo (25). Este grupo prostético marcado está cargado positivamente al pH lisosómico y de este modo tiene una retención celular incrementada (33). El aumento de retención es potencialmente útil cuando se considera un anticuerpo para la radioinmunoterapia y se podría utilizar este método para mejorar la retención de mAb 806 yodado o sus fragmentos.

Ejemplo 8

Unión de mAb 806 a células que contienen EGFR amplificado

Para examinar si mAb 806 podía reconocer el EGFR expresado en células que contienen un gen receptor amplificado, se analizó su unión a células A431. Como se ha descrito previamente, las células A431 son células de carcinoma escamoso humano y expresan elevados niveles de wtEGFR. Se observó una unión de mAb 806 a las células A431 baja, pero altamente reproducible mediante análisis FACS (Figura 6). El anticuerpo DH8.3 no se unió a las células A431, indicando que la unión de mAb 806 no era el resultado del bajo nivel de expresión de de2-7 EGFR (Figura 6). Como se esperaba, el anticuerpo 528 anti-EGFR mostró una fuerte tinción de las células A431 (Figura 6). Dado este resultado, la unión de mAb 806 a A431 fue caracterizada por medio de un análisis Scatchard. Si bien la unión de mAb 806 yodado fue comparativamente baja, fue posible obtener datos consistentes para Scatchard. La media de tales experimentos dio un valor para la afinidad de $9,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ con $2,4 \times 10^5$ receptores por célula. De este modo la afinidad para este receptor fue de alrededor de 10 veces más baja que la afinidad para el de2-7 EGFR. Además, el mAb 806 parecía reconocer solamente una pequeña porción de EGFR unido sobre la superficie de las células A431. Utilizando el anticuerpo 528, los autores de la invención midieron aproximadamente 2×10^6 receptores por célula o que coincide con otros numerosos estudios (26).

El reconocimiento del sEGFR de tipo salvaje por el mAb 806 requiere claramente una cierta desnaturalización del receptor con el fin de exponer el epítipo. El grado de desnaturalización requerido es sólo ligero ya que incluso la absorción del sEGFR de tipo salvaje sobre una superficie de plástico indujo una unión robusta del mAb 806 en los análisis ELISA. Como el mAb 806 solamente se unió a aproximadamente un 10% del EGFR sobre la superficie de las células A431, resulta tentador especular que este subgrupo de receptores puede tener una conformación alterada similar a la inducida por el truncamiento de2-7 EGFR. En efecto, la expresión extremadamente elevada del EGFR mediada por la amplificación génica en células A431, puede ocasionar que algunos receptores sean procesados incorrectamente conduciendo a una alteración de la conformación. De manera interesante, la inmunotransferencia semi-cuantitativa de los productos lisados de células A431 con mAb 806 mostró que éste podía reconocer la mayor parte de los receptores EGF de A431 después de SDS-PAGE y transferencia western. Este resultado apoya adicionalmente el argumento de que el mAb 806 se está uniendo a un subgrupo de receptores sobre la superficie de las células A431 que tienen una conformación alterada. Estas observaciones en las células A431 coinciden con los datos inmunohistoquímicos que demuestran que mAb 806 se une a los gliomas que contienen la amplificación del gen EGFR. Como la unión de mAb 806 fue completamente negativa sobre las células U87MG parentales podría parecer que este fenómeno está restringido a las células que contienen EGFR amplificado aunque el nivel de receptor “desnaturalizado” sobre la superficie de las células U87MG puede estar por debajo del nivel de detección. No obstante, esto parecería improbable ya que el mAb 806 yodado no se unía a los sedimentos de células U87MG que contenían hasta 1×10^7 células.

Ejemplo 9

*Localización *in vivo* de células A431 por MAb 806*

Se realizó un segundo estudio de biodistribución con mAb 806 para determinar si éste podía localizar xenoinjertos de tumor A431. El estudio se llevó a cabo a lo largo de un período de tiempo con el fin de obtener más información referente a la localización de xenoinjertos U87MG.Δ2-7 por mAb 806, que fueron incluidos en todos los ratones como control positivo. Además, se incluyó el anticuerpo anti-EGFR 528 como control positivo para los xenoinjertos A431, puesto que un estudio previo demostró una localización baja pero significativa de este anticuerpo para las células A431 desarrolladas en ratones carentes de sistema inmunitario (21).

Durante las primeras 48 horas, mAb 806 presentó propiedades de localización casi idénticas a las observadas en los experimentos iniciales (Figura 7A en comparación con la Figura 4A). En términos de % DI/g de tumor, los niveles de mAb 806 en xenoinjertos U87MG.Δ2-7 disminuían lentamente después de 24 h pero siempre permanecían superiores a los niveles detectados en tejido normal. La absorción en los xenoinjertos A431 fue comparativamente baja, no obstante hubo un pequeño incremento en % DI/g de tumor durante las primeras 24 h no observado en tejidos normales tales como el hígado, bazo, riñón y pulmón (Figura 7A). La absorción del anticuerpo 528 fue muy lenta en ambos xenoinjertos cuando se expresaba en forma de % DI/g de tumor (Figura 7B) debido en parte al aclaramiento más rápido de este anticuerpo de la sangre. En términos de razón de tumor con respecto a sangre el mAb 806 presentaba un máximo a las 72 h para los xenoinjertos U87MG.Δ2-7 y a las 100 h para los xenoinjertos A431 (Figura 8A,B). Si bien la razón de tumor con respecto a sangre para mAb 806 nunca sobrepasaba 1,0 con respecto al tumor A431, ésta aumentó a lo largo de todo el transcurso de tiempo (Figura 8B) y fue superior que en todos los demás tejidos examinados (datos no mostrados) indicando bajos niveles de localización.

ES 2 334 494 T3

La razón de tumor con respecto a sangre para el anticuerpo 528 mostró un perfil similar para mAb 806 aunque se observaron niveles superiores en los xenoinjertos A431 (Figura 8A,B). El mAb 806 tuvo una razón de tumor con respecto a hígado máxima en los xenoinjertos U87MG.Δ2-7 de 7,6, a las 72 h, demostrando claramente una absorción preferente en estos tumores en comparación con el tejido normal (Figura 8C). Otras razones de tumor con respecto a órgano para mAb 806 fueron similares a las observadas en el hígado (datos no mostrados). La razón de tumor con respecto a hígado máxima para mAb 806 en los xenoinjertos A431 fue de 2,0 a las 100 h, indicando de nuevo una absorción ligeramente preferente en el tumor en comparación con el tejido normal (Figura 8D).

Ejemplo 10

Estudios de terapia

Se evaluaron los efectos de mAb806 en dos modelos de enfermedad por xenoinjerto - un modelo preventivo y un modelo de tumor establecido.

Modelos de Xenoinjerto

Coincidiendo con informes previos (Nishikawa *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91(16); 7727-7731) las células U87MG transfectadas con de2-7 EGFR crecieron más rápidamente que las células parentales y las células U87MG transfectadas con wt EGFR. Por lo tanto, no fue posible hacer crecer ambos tipos de células en los mismos ratones.

Se inocularon simultáneamente 3×10^6 células tumorales en 100 ml de PBS en ambos flancos de ratones hembra de 4-6 semanas de edad ratones carentes de sistema inmunitario (Animal Research Centre, Western Australia, Australia). Se investigó la eficacia terapéutica de mAb 806 en modelos tanto preventivos como de tumor establecido. En el modelo preventivo, se trataron 5 ratones con 2 xenoinjertos cada uno intraperitonealmente con 1 o 0,1 mg de mAb 806 o vehículo (PBS) empezando el día antes de la inoculación de las células tumorales. El tratamiento continuó durante un total de 6 dosis, 3 veces por semana durante 2 semanas. En el modelo establecido, el tratamiento se inició cuando los tumores hubieron alcanzado un volumen medio de $65 \pm 6,42 \text{ mm}^3$ (U87MG.Δ2-7), $84 \pm 9,07 \text{ mm}^3$ (U87MG), $73 \pm 7,5 \text{ mm}^3$ (U87MG.wtEGFR) o $201 \pm 19,09 \text{ mm}^3$ (tumores A431). El volumen del tumor en mm^3 se determinó utilizando la fórmula $(\text{longitud} \times \text{anchura}^2)/2$, donde la longitud era el eje más largo y la anchura la medida en los ángulos rectos con respecto a la longitud (Scott *et al*, 2000). Los datos se expresaron como el volumen medio del tumor \pm D.T. para cada grupo de tratamiento. El análisis estadístico se realizó en momentos puntuales dados utilizando el test de la t de Student. Los animales se sometieron a eutanasia cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen aproximado de $1,5 \text{ cm}^3$ y los tumores se extirparon para el examen histológico. Este proyecto de investigación fue aprobado por el Animal Ethics Committee del Austin and Repatriation Medical Centre.

Examen Histológico de Xenoinjertos de Tumores

Se extirparon los xenoinjertos y se diseccionaron. La mitad se fijó con formalina/PBS al 10% antes de embeberla en parafina. Después se cortaron secciones de cuatro micras y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para el examen histológico rutinario. La otra mitad se embebió en el compuesto Tissue Tek[®] OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA), se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C . Se cortaron secciones criostáticas finas (5 micras) y se fijaron en acetona enfriada con hielo durante 10 min seguido de secado al aire durante 10 min más. Las secciones se bloquearon en reactivo de bloqueo de proteína (Lipshaw Immunon, Pittsburgh EEUU) durante 10 min y después se incubaron con anticuerpo primario biotinilado (1 mg/ml), durante 30 min a la temperatura ambiente (RT). Todos los anticuerpos fueron biotinilados utilizando el módulo de biotinilación de proteína ECL (Amersham, Baulkham Hills, Australia), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Después de enjuagar con PBS, las secciones se incubaron con un complejo de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante durante 30 minutos más (Silenus, Melbourne, Australia). Tras un lavado con PBS final las secciones se expusieron a sustrato de 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) (ácido acético 0,1 M, acetato de sodio 0,1 M, AEC 0,02 M (Sigma Chemical Co., St Louis, MO)) en presencia de peróxido de hidrógeno durante 30 min. Las secciones se enjuagaron con agua y se contratiñeron con hematoxilina durante 5 minutos y se montaron.

Eficacia de mAb 806 en el Modelo Preventivo

Se examinó el mAb 806 en busca de su eficacia contra tumores U87MG y U87MG.Δ2-7 en un modelo de xenoinjerto preventivo. Se administraron anticuerpo o vehículo i.p. el día antes de la inoculación del tumor y se administró 3 veces por semana durante 2 semanas. El mAb 806 no tuvo efecto sobre el crecimiento de xenoinjertos U87MG parentales, que expresan wt EGFR, a una dosis de 1 mg por inyección (Figura 9A). En contraste, mAb 806 inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos U87MG.Δ2-7 de una manera dependiente de la dosis (Figura 9B). El día 20, cuando los animales de control fueron sacrificados, el volumen medio del tumor fue de $1637 \pm 178,98 \text{ mm}^3$ para el grupo de control, estadísticamente más pequeño $526 \pm 94,74 \text{ mm}^3$ para el grupo al que se había inyectado 0,1 mg ($p < 0,0001$) y $197 \pm 42,06 \text{ mm}^3$ para el grupo al que se había inyectado 1 mg ($p < 0,0001$). Los grupos de tratamiento fueron sacrificados el día 24 en cuyo momento el volumen medio de los tumores era de $1287 \pm 243,03 \text{ mm}^3$ para el grupo tratado con 0,1 mg y $492 \pm 100,8 \text{ mm}^3$ para el grupo tratado con 1 mg.

Eficacia de mAb 806 en el Modelo de Xenoinjerto Establecido

Dada a eficacia del mAb 806 en el modelo de xenoinjerto preventivo, se examinó después su capacidad para inhibir el crecimiento de xenoinjertos de tumores establecidos. El tratamiento con anticuerpo fue el descrito en el

modelo preventivo excepto que comenzó cuando los tumores habían alcanzado un volumen medio del tumor de $65 \pm 6,42 \text{ mm}^3$ para los xenoinjertos U87MG. Δ 2-7 y $84 \pm 9,07 \text{ mm}^3$ para los xenoinjertos U87MG parentales. Una vez más, mAb 806 no tuvo efecto sobre el crecimiento de xenoinjertos U87MG parentales a una dosis de 1 mg por inyección (Figura 10A). En contraste, el mAb 806 inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos U87MG. Δ 2-7 de una manera dependiente de la dosis (Figura 10B). El día 17, un día antes de que los animales de control fueran sacrificados, el volumen medio del tumor fue de $935 \pm 215,04 \text{ mm}^3$ para el grupo de control, $386 \pm 57,51 \text{ mm}^3$ para el grupo al que se había inyectado 0,1 mg ($p < 0,01$) y $217 \pm 58,17 \text{ mm}^3$ para el grupo al que se había inyectado 1 mg ($p < 0,002$).

Para examinar si la inhibición del crecimiento observada con mAb 806 estaba restringida a la célula que expresaba de2-7 EGFR, se examinó su eficacia contra xenoinjertos de tumor U87MG.wtEGFR en un modelo establecido. Estas células sirven como modelo para tumores que contienen la amplificación del gen EGFR sin la expresión de de2-7 EGFR. El tratamiento con mAb 806 comenzó cuando los tumores hubieron alcanzado un volumen medio del tumor de $73 \pm 7,5 \text{ mm}^3$. El mAb 806 inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos U87MG.wtEGFR establecidos cuando se comparó con los tumores de control tratados con vehículo (Figura 10C). El día que los animales de control fueron sacrificados, el volumen medio del tumor era de $960 \pm 268,9 \text{ mm}^3$ para el grupo de control y $468 \pm 78,38 \text{ mm}^3$ para el grupo tratado con inyecciones de 1 mg ($p < 0,04$).

Análisis Histológico e Inmunológico de Tumores Establecidos

Para evaluar las diferencias histológicas potenciales entre los xenoinjertos U87MG. Δ 2-7 y U87MG.wtEGFR tratados con mAb 806 y de control (recogidos los días 24 y 42 respectivamente), se tiñeron con H&E las secciones embebidas en parafina, fijadas con formalina. Se observaron zonas de necrosis en las secciones de xenoinjertos tanto U87MG. Δ 2-7 (recogidos 3 días después del finalizar el tratamiento), como U87MG.wtEGFR (recogidos 9 días antes de finalizar el tratamiento) tratados con mAb 806. Este resultado fue observado sistemáticamente en numerosos xenoinjertos de tumores ($n=4$). Sin embargo, el análisis de las secciones de xenoinjertos tratados con control no presentó las mismas zonas de necrosis observadas con el tratamiento con mAb 806. Las secciones de xenoinjertos U87MG tratadas con mAb 806 o control también fueron teñidas con H&E y no revelaron diferencias en la viabilidad celular entre los dos grupos, apoyando adicionalmente la hipótesis de que la unión a mAb 806 induce un descenso de la viabilidad celular/necrosis en xenoinjertos tumorales.

Se realizó un análisis inmunohistoquímico de secciones de xenoinjerto U87MG, U87MG. Δ 2-7 y U87MG.wtEGFR para determinar los niveles de expresión de de2-7 y wt EGFR después del tratamiento con mAb806. Las secciones se recogieron los días 24 y 42 como antes, y se inmunotiñeron con los anticuerpos 528 o 806. Como se esperaba el anticuerpo 528 tiñó todas las secciones de xenoinjerto sin un descenso obvio en la intensidad los tumores tratados y de control. La tinción de las secciones de U87MG no fue detectable con el mAb 806, no obstante se observó una tinción positiva de las secciones de xenoinjerto U87MG. Δ 2-7 y U87MG.wtEGFR. No hubo diferencia en la densidad de tinción con mAb 806 entre los xenoinjertos U87MG. Δ 2-7 y U87MG.wtEGFR tratados y de control sugiriendo que el tratamiento con anticuerpo no regula la expresión de de2-7 o wt EGFR.

Tratamiento de Xenoinjertos A431 con mAb 806

Para demostrar que los efectos anti-tumorales de mAb 806 no estaban restringidos a las células U87MG, se administró el anticuerpo a ratones con xenoinjertos A431. Estas células contienen un gen EGFR amplificado y expresan aproximadamente 2×10^6 receptores por célula. Como se ha descrito antes, mAb 806 se une a aproximadamente 10% de estos EGFR y xenoinjertos A431 diana. El mAb 806 inhibió significativamente el crecimiento de los xenoinjertos A431 cuando se examinó en el modelo de xenoinjerto preventivo descrito previamente (Figura 11A). El día 13, cuando las animales de control fueron sacrificados, el volumen medio del tumor fue de $1385 \pm 147,54 \text{ mm}^3$ en el grupo de control y de $260 \pm 60,33 \text{ mm}^3$ para el grupo con tratamiento de inyecciones de 1 mg ($p < 0,0001$).

En un experimento separado, una dosis de 0,1 mg de mAb también inhibió significativamente el crecimiento de los xenoinjertos A431 en un modelo preventivo.

Dada la eficacia de mAb 806 en el modelo de xenoinjerto A431, se examinó su eficacia para inhibir el crecimiento de los xenoinjertos de tumores establecidos. El tratamiento con anticuerpo fue el descrito en el modelo preventivo excepto que no comenzó hasta que los tumores hubieron alcanzado un volumen medio del tumor de $201 \pm 19,09 \text{ mm}^3$. El mAb 806 inhibió significativamente el crecimiento de los xenoinjertos de tumores establecidos (Figura 11B). El día 13, cuando los animales de control fueron sacrificados, el volumen medio del tumor fue de $1142 \pm 120,06 \text{ mm}^3$ para el grupo de control y de $451 \pm 65,58 \text{ mm}^3$ para el grupo al que se inyectaba 1 mg ($p < 0,0001$).

En resumen, los estudios de terapia con mAb 806 descritos aquí demostraron claramente la inhibición dependiente de la dosis del crecimiento del xenoinjerto U87MG. Δ 2-7. En contraste, no se observó inhibición de los xenoinjertos U87MG parentales a pesar del hecho de que continúan expresando el wt EGFR *in vivo*. El mAb 806 no solamente redujo significativamente el volumen del xenoinjerto, también indujo una necrosis significativa en el tumor. Este es el primer informe que muestra el uso terapéutico satisfactorio de semejante anticuerpo *in vivo* contra xenoinjertos de glioma que expresan de2-7 EGFR humano.

La amplificación génica del EGFR ha sido referida en numerosos tumores diferentes y se observa en aproximadamente 50% de los gliomas (Voldberg *et al.*, 1997). Se ha propuesto que la posterior expresión en exceso de EGFR mediada por la amplificación génica del receptor puede conferir una ventaja de crecimiento incrementando la señali-

zación intracelular y el crecimiento celular (Filmus *et al*, 1987). La línea celular U87MG fue transfectada con el wt EGFR con el fin de producir una célula de glioma que imite el proceso de amplificación del gen EGFR. El tratamiento de los xenoinjertos U87MG.wtEGFR establecidos con mAb 806 dio como resultado una inhibición significativa del crecimiento. De este modo, mAb 806 también media la actividad anti-tumoral *in vivo* frente a células que contienen la amplificación del gen EGFR. De manera interesante, la inhibición por mAb 806 de los xenoinjertos U87MG.wtEGFR parece ser menos eficaz que la observada con tumores U87MG.Δ2-7. Esto refleja probablemente el hecho de que mAb 806 tiene una afinidad de unión inferior por el EGFR amplificado y solamente se une a una pequeña proporción de receptores expresados sobre la superficie celular. No obstante, se debe observar que a pesar del pequeño efecto sobre los volúmenes de los xenoinjertos U87MG.wtEGFR, el tratamiento con mAb 806 producía grandes zonas de necrosis en estos xenoinjertos. Para descartar la posibilidad de que mAb 806 solamente medie la inhibición de las líneas celulares derivadas de U87MG los autores de la presente invención sometieron a ensayo su eficacia contra xenoinjertos A431. Esta línea celular derivada de carcinoma de células escamosas contiene una amplificación del gen EGFR significativa que se conserva tanto *in vitro* como *in vivo*. El tratamiento de los xenoinjertos A431 con mAb 806 produjo una inhibición significativa del crecimiento en el modelo tanto preventivo como establecido, indicando que los efectos anti-tumorales de mAb 806 no están restringidos a las líneas celulares U87MG transfectadas.

Ejemplo 11

Tratamiento de terapia combinada de xenoinjertos A431 con MAb806 y AG1478

Se sometieron a ensayo los efectos anti-tumorales de mAb 806 combinado con AG1478 en ratones con xenoinjertos A431. AG1478 (4-(3-Cloroanilino)-6,7-dimetoxiquinazolina) es un inhibidor potente y selectivo de la quinasa de EGFR quinasa frente a HER2-neu y la quinasa del receptor de crecimiento derivado de plaquetas (Calbiochem Cat. Núm. 658552). Se incluyeron tres controles: tratamiento con vehículo solamente, vehículo + mAb806 solamente y vehículo + AG1478 solamente. Los resultados se ilustran en la Figura 12. Se administraron 0,1 mg de mAb 806 1 día antes en el xenoinjerto y 1, 3, 6, 8 y 10 días después del xenoinjerto. Se administraron 400 μ g de AG1478 los días 0, 2, 4, 7, 9, y 11 después del xenoinjerto.

Tanto AG1478 como mAb806, cuando se administraron solos produjeron una reducción significativa del volumen del tumor. Sin embargo, combinados, la reducción del volumen del tumor aumentaba enormemente.

Además, se evaluó la unión de mAb806 a EFR de células A431 en ausencia y presencia de AG1478. Las células se colocaron en medio sin suero durante la noche, después se trataron con AG1478 durante 10 min a 37°C, se lavaron dos veces en PBS luego se lisaron en Triton al 1% y se prepararon los productos lisados. Los productos lisados se prepararon como se describe en el Ejemplo 20 de la presente memoria. Después se evaluó el producto lisado en busca de la reactividad 806 mediante ELISA en una versión modificada de un análisis descrito por Schooler y Wiley, Analytical Biochemistry 277,135-142 (2000). Las placas se recubrieron con 10 μ g/ml de mAb 806 en PBS/EDTA durante la noche a la durante la noche a la temperatura ambiente y después se lavaron dos veces. Las placas se bloquearon después con albúmina de suero/PBS al 10% durante 2 horas a 37°C y se lavaron dos veces. Se añadió producto lisado celular 1:20 en albúmina de suero/PBS al 10% durante 1 hora a 37°C, después se lavó cuatro veces. Se hizo reaccionar anti-EGFR (SC-03 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)) en albúmina de suero/PBS al 10% 90 min a la temperatura ambiente, la placa se lavó cuatro veces, y se añadió anti-conejo-HRP (1:2000 si es de Silenus) en albúmina de suero/PBS al 10% durante 90 min a la temperatura ambiente, se lavó cuatro veces, y se hizo que se desarrollara color utilizando ABTS como sustrato. Se descubrió que la unión de mAb806 aumentaba significativamente en presencia de cantidades crecientes de AG1478 (Figura 13).

Ejemplo 12

Inmunorreactividad en glioblastomas humanos pre-tipificados por el estado de EGFR

Dada la elevada incidencia de la expresión, amplificación y mutación de EGFR en los glioblastomas, se realizó un estudio inmunohistoquímico detallado con el fin de evaluar la especificidad de 806 en tumores distintos de los xenoinjertos. Se analizó un panel de 16 glioblastomas mediante inmunohistoquímica. Este panel de 16 glioblastomas fue previamente tipificado mediante RT-PCR en busca de la presencia de la expresión de EGFR de tipo salvaje amplificado y de2-7 EGFR. Seis de estos tumores expresaron solamente el transcrito wt EGFR, 10 tenían una amplificación del gen wtEGFR mostrado 5 de estos transcritos EGFR de tipo salvaje solamente, y 5 tanto EGFR de tipo salvaje como transcrito del gen de2-7. Se realizó un análisis inmunohistoquímico utilizando secciones de 5 mm de tejido recién congelado aplicado a portas histológicos y fijados durante 10 minutos en acetona fría. Se detectó el anticuerpo primario unido con anticuerpo anti-ratón de caballo biotinilado seguido de una reacción de complejo de avidina-biotina. Se utilizó tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (DAB) como cromógeno. El grado de reactividad inmunohistoquímica en los tejidos se estimó mediante microscopía óptica y se graduó de acuerdo con el número de células inmunorreactivas en incrementos del 25% como sigue:

Focal = menos de 5%

+ = 5-25%

++ = 25-50%

ES 2 334 494 T3

+++ = 50-75%

++++ = >75%

5 El anticuerpo 528 mostró una intensa reactividad en todos los tumores, mientras la inmunotinción con DH 8.3 estuvo restringida a aquellos tumores que expresaban de2-7 EGFR (Tabla 2). Coincidiendo con las observaciones previas en FACS y en los análisis de reajuste, el mAb 806 no reaccionó con los glioblastomas que expresaban el transcrito wtEGFR a partir de genes EGFR no amplificados (Tabla 2). Este patrón de reactividad para mAb 806 es similar al observado en los estudios con xenoinjertos y de nuevo sugiere que este anticuerpo reconoce el EGFR de2-7
10 y el amplificado pero no el wtEGFR cuando son expresados sobre la superficie celular.

TABLA 2

15 Inmunorreactividad de los MAbs 528, DH8.3 y 806 sobre glioblastomas previamente tipificados en busca de la presencia de EGFR y de tipo salvaje y de2-7 mutado y en busca de su estado de amplificación.

20 Amplificación	de2-7 EGFR	528	DH 8.3	806
	<u>Expresión</u>			
	No	++++	-	-
25	No	++++	-	- *
	No	++++	-	-
30	No	++	-	-
	No	+++	-	-
35	No	++++	-	-
	Si	No	++++	-
	Si	No	++++	+
40	Si	No	++++	+++
	Si	No	++++	++++
45	Si	No	++++	+ - + + + +
	Si	Si	++++	++++
50	Si	Si	++++	++++
	Si	Si	++++	++++
55	Si	Si	++++	++++
	Si	Si	++++	++
				++

* tinción focal

60 Ejemplo 13

Inmunorreactividad EGFR en tejido normal

65 Con el fin de determinar si el EGFR de2-7 es expresado en tejido normal, se llevó a cabo un estudio inmunohistoquímico con mAb 806 y DH8.3 en un panel de 25 tejidos. No hubo una inmunorreactividad fuerte con mAb 806 o DH8.3 en ningún tejido sometido a ensayo sugiriendo que el de2-7 EGFR está ausente en tejidos normales (Tabla 3).

ES 2 334 494 T3

Hubo una cierta tinción variable en amígdalas con mAb 806 que estuvo restringida a la capa de células basales de la epidermis y las células escamosas de la mucosa del epitelio. En placenta, se observó una inmunotinción ocasional del epitelio del trofoblasto. De manera interesante, dos tejidos que expresan elevados niveles endógenos de wtEGFR, hígado y piel, no lograron mostrar ninguna reactividad con mAb 806 significativa. No se observó reactividad con las muestras de hígado en absoluto, y solamente se detectó ocasionalmente una reactividad focal débil y desigual (en no más de 10% de todas las muestras estudiadas) en queratinocitos basales en muestras de sangre y en epitelio escamoso de la mucosa de la amígdala, demostrando adicionalmente que este anticuerpo no se une al wtEGFR expresado sobre la superficie de las células en un grado significativo (Tabla 3). Todos los tejidos fueron positivos para el wtEGFR como indicó la tinción universal observada con el anticuerpo 528 (Tabla 3).

TABLA 3

Reactividad de 528, DH8.3 y 806 en tejidos normales.			
TEJIDO	528	DH8-3	806
Esófago	pos	-	-
Estómago	pos	-	-
Duodeno	pos	-	-
Intestino delgado/duodeno	pos	-	-
Colon	pos	-	-
Hígado	pos	-	-
Glándulas salivares (parótida)	pos	-	-
Riñón	pos	-	-
Vejiga urinaria	pos	-	-
Próstata	pos	-	-
Testículo	pos	-	-
Útero (cx/endom)	pos	- *	-
Trompa de Falopio	pos	-	-
Ovario	pos	-	-
Mama	pos	- *	-
Placenta	pos	-	-
Nervio periférico	pos	-	-
Músculo esquelético	pos	-	-
Glándula tiroides	pos	-	-
Nódulo linfático	pos	-	-

ES 2 334 494 T3

Reactividad de 582, DH8.3 y 806 en tejidos normales.			
Bazo	pos	-	-
Amígdala	pos	-	- reactividad débil ocasional de la capa basal del epitelio escuamoso
Corazón	pos	-	-
Pulmón	pos	-	-
Piel	pos	-	- reactividad débil ocasional de la capa basal del epitelio escuamoso
* cierta tinción estromática en diferentes tejidos			

Ejemplo 14

Inmunorreactividad EGFR en diferentes tumores

Se examinó el grado de de2-7 EGFR en otros tipos de tumores utilizando un panel de 12 malignidades diferentes. El anticuerpo 528 mostró a menudo una tinción homogénea en muchos tumores analizados excepto melanoma y seminoma. Cuando estaba presente, la inmunorreactividad con DH8.3 estaba restringida a la célula tumoral focal ocasional indicando que hay una pequeña expresión de de2-7 EGFR, si la hay, en los tumores fuera del cerebro utilizando este sistema de detección (Tabla 4). También hubo una tinción focal de los vasos sanguíneos y una tinción difusa variable del tejido conectivo con el anticuerpo DH8.3 en algunos tumores (Tabla 4). Esta tinción era fuertemente dependiente de la concentración de anticuerpo utilizado y se consideraba reactividad de fondo no específica. El mAb 806 mostró una tinción positiva en 64% de los tumores de cabeza y cuello y en 50% de los carcinomas de pulmón (Tabla 4). Hubo poca reactividad con mAb 806 excepto en tumores urinarios que eran positivos en 30% de los casos. Puesto que los cánceres de cabeza y cuello y pulmón fueron negativos para el anticuerpo DH8.3 la reactividad observada con el mAb en estos tumores se puede asociar con la amplificación del gen EGFR.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 334 494 T3

TABLA 4

Anticuerpos monoclonales 528, DH8.3 y 806 del panel de tumores.			
Tumor	528	DH8.3	806
Metástasis de melanoma maligno	0/10	0/10	0/10
Vejiga urinaria (tcc, sqcc, adeno)	10/10 (7x++++, 2x+++, 1x+)	0/10*	3/10* (2x++++, 1x++)
Glándula mamaria	6/10 (3x++++, 3x++)	1/10 (1x+)	1/10 (foc)
Cáncer de cabeza + cuello (sqcc)	11/11 (1x+++ - 10x++++)	0/11*	7/11 (3x++++, 3x+++, 1x+)
Pulmón (sqcc, adeno, neuroend)	12/12 (10x++++-1x+++)	0/12*	6/12 (3x++++ 3x+++)
Leiomiomasarcoma	5/5 (4x++++, 1x+)	0/5	0/5
Liposarcoma	5/5 (2x + 3x +++)	0/5	0/5*
Sarcoma sinovial	4/5* (4x +++)	0/5	0/5*

ES 2 334 494 T3

Anticuerpos monoclonales 528, DH8.3 y 806 del panel de tumores.			
Histiocitoma fibroso maligno Mfh	4/5*	0/5*	0/5*
Carcinoma colónico	10/10 (9x++++, 1x+)	0/10*	0/10
Seminoma	1/10*	1/10*	0/10
Ovario (seroso-papilar)	4/5 (3x++++, 1x+)	0/5*	0/5
*tinción focal			

Ejemplo 15

Inmunorreactividad en glioblastomas humanos no seleccionados por el estado de EGFR

Con el fin de confirmar la especificidad única y evaluar la reactividad del mAb 806, éste se comparó con los anticuerpos 528 y DH8.3 en un panel de 46 glioblastomas no preseleccionados por su estado de EGFR. El anticuerpo 528 fue fuertemente y homogéneamente positivo en todas las muestras excepto dos (Núm. 27 y 29) (44/46, 95,7%). Estos dos casos también fueron negativos para mAb806 y mAb DH8.3. El mAb 806 fue positivo en 27/46 (58,7%) casos, 22 de los cuales presentaron una inmunorreactividad homogénea en más del 50% del tumor. El anticuerpo DH8.3 fue positivo en 15/46 (32,6%) glioblastomas, 9 de los cuales mostraron una inmunorreactividad homogénea. La tinción inmunohistoquímica de estos tumores no seleccionados se tabula en la Tabla 5.

Hubo concordancia entre mAb 806 y DH8.3 en todos los casos excepto uno (Núm. 35).

Se realizó un análisis molecular en cuanto a la presencia de amplificación de EGFR en 44 casos (Tabla 5). De estos, 30 casos se tipificaron simultáneamente con el patrón de inmunorreactividad de mAb 806 previamente establecido: p. ej. 16 casos negativos para mAb 806 no revelaron amplificación de EGFR y 14 casos con EGFR amplificado también fueron inmunopositivos para mAb 806. No obstante, 13 casos, que mostraron inmunorreactividad con 806, fueron negativos para la amplificación de EGFR mientras 1 caso con EGFR amplificado fue negativo para mAb 806. Más abajo se describe el análisis adicional del estado de mutación de estos casos negativos para la amplificación y positivos para 806 y proporciona una explicación para la mayoría de los 13 casos que fueron negativos para la amplificación de EGFR amplificación y fueron reconocidos por 806.

Con posterioridad, se realizó un análisis molecular de la mutación por delección mediante RT-PCR en 41/46 casos (Tabla 5). De estos, 34 casos se tipificaron simultáneamente con DH8.3 específico para la mutación por delección: 12 casos fueron positivos tanto en RT-PCR como en la inmunohistoquímica y 22 casos fueron negativo/negativo. Tres casos (Núm. 2, Núm. 34, Núm. 40) fueron DH8.3 positivo/RT-PCR negativo para la mutación por delección y tres casos (Núm. 12, Núm. 18, Núm. 39) fueron DH8.3 negativo/RT-PCR positivo. Como se esperaba basándose en el análisis de especificidad previo de los autores de la presente invención, la inmunorreactividad con mAb 806 se observó en todos los tejidos DH8.3-positivos excepto en un caso (Núm. 35).

El Caso Núm. 3 también reveló una mutación (designada A2 en la Tabla 5), que incluía las secuencias de la mutación de2-7 pero esta no parecía ser la delección de2-7 clásica de 801 bases (datos no mostrados). Este caso fue negativo para la reactividad con DH8.3 pero mostró reactividad con 806, indicando que 806 puede reconocer una mutación de EGFR adicional y posiblemente única.

ES 2 334 494 T3

TABLA 5

5 Análisis Inmunohistoquímico de 46 glioblastomas no
 10 seleccionados con los mAbs 528, 806, y DH8.3

Núm.	528	806	DH8.3	EGFR Amp.*	MUT 5'
1	++++	++++	++	A	MUT 5'
2	++++	++++	++++	N	WT
3	++++	++++ (det.)	neg.	N	A2
4	++++	++++	neg.	N	WT
5	++++	++++	++++	N	5' MUT
6	++++	++++	neg.	<u>A</u>	WT
7	++++	++++	++++	N	5' MUT
8	++++	++++	++++	<u>A</u>	5' MUT
9	++++	++++	neg.	<u>A</u>	WT
10	++++	neg.	neg.	N	WT
11	++	++	++	<u>A</u>	5' MUT
12	++++	++	neg.	<u>A</u>	5' MUT
13	++++	++++	neg	N	WT
14	++	neg.	neg.	Nr	nr

15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

ES 2 334 494 T3

Análisis Inmunohistoquímico de 46 glioblastomas no seleccionados con los mAbs 528, 806, y DH8.3

Núm.	528	806	DH8.3	EGFR Amp.*	MUT 5'
15	++	++	neg	N	WT
16	+	neg.	neg.	N	nr
17	++++	neg.	neg.	N	WT
18	++++	++++	neg.	A	5' MUT
19	++++	++++	neg.	N	WT
20	++++	neg.	neg	N	WT
21	++++	++++	neg.	N	WT
22	++++	neg.	neg.	N	WT
23	++++	++++	++	N	5' MUT
24	++++	++++	neg.	A	WT
25	++++	neg.	neg.	N	WT
26	++++	++++	+++	<u>A</u>	5' MUT
27	neg.	neg.	neg.	N	WT
28	+++	neg.	neg.	N	WT
29	neg.	neg.	neg.	N	WT
30	++++	++++	neg.	N	WT
31	++++ par det	neg.	neg.	N	nr
32	++	+++	++	N	5' MUT
33	+++	++++	++++	A	5' MUT
34	++++	+++	++++	N	WT
35	++++	neg.	++++	<u>A</u>	5' MUT
36	+++	++	+++	<u>A</u>	5' MUT
37	++++	+	+	<u>A</u>	5' MUT

ES 2 334 494 T3

Análisis Inmunohistoquímico de 46 glioblastomas no seleccionados con los mAbs 528, 806, y DH8.3					
Núm.	528	806	DH8.3	EGFR Amp.*	MUT 5'
38	++++	neg.	neg.	N	WT
39	++	neg.	neg.	N	5' MUT
40	++++	++++	+	<u>A</u>	WT
41	++	neg.	neg.	N	WT
42	++++	++++	neg.	<u>A</u>	WT
43	++++	neg.	neg.	nr	nr
44	++++	neg.	neg.	N	WT
45	++++	neg.	neg.	N	WT
46	++++	neg.	neg.	N	nr

* N = no amplificado, A-amplificado,
 †WT = tipo salvaje, mut 5'
 nr = no realizado

La reactividad del anticuerpo 806 se tipificó simultáneamente con EGFR amplificado o de2-7 mutante en 19/27 o en más del 70% de los casos. Es notable que 2 de estos 8 casos también fueran reactivos con DH8.3.

Ejemplo 16

Tratamiento generalizado y análisis tumores de glioma intracraneal

Para someter a ensayo la eficacia del anticuerpo monoclonal anti- Δ EGFR, mAb 806, los autores de la presente invención trataron ratones carentes de sistema inmunitario que portaban xenoinjertos de glioma intracraneales que expresaban en exceso Δ EGFR con inyecciones intraperitoneales de mAb806, el isotipo de control IgG o PBS.

Las líneas celulares de glioblastoma humano U87MG, LN-Z308 y A1207 (donación del Dr. S. Aaronson, Mount Sinai Medical Center, New York, NY) fueron infectadas con virus con Δ EGFR, Δ EGFR carente de quinasa (DK), o EGFR de tipo salvaje (wtEGFR). La poblaciones que expresaban niveles elevados similares de EGFR se seleccionaron mediante clasificación celular activada por fluorescencia y se denominaron U87MG. Δ EGFR, U87MG.DK, U87MG.wtEGFR, LN-Z308. Δ EGFR, LN-Z308.DK, LN-Z308. wtEGFR, A1207. Δ EGFR, A1207.DK y A1207.wtEGFR, respectivamente. Cada una se mantuvo en medio que contenía G418 (líneas celulares U87MG, 400 μ g/ml; LN-Z308 y líneas celulares A1207, 800 μ g/ml).

Las células U87MG. Δ EGFR se implantaron intracranealmente en ratones carentes de sistema inmunitario y los tratamientos comenzaron el mismo día. Se implantaron 10^5 células en 5 μ l de PBS en el cuerpo estriado derecho de los cerebros de los ratones carentes de sistema inmunitario. La terapia generalizada con mAb 806, o el control de isotipo IgG2b, se completó mediante inyección i.p. de 1 mg de mAb en un volumen de 100 μ l en días alternos desde el día 0 post-implantación hasta el día 14. Para la terapia directa de los tumores U87MG. Δ EGFR intracerebrales, se inyectaron 10 μ g de mAb 806, o el control de isotipo IgG2b, en un volumen de 5 μ l en el sitio de la inyección del tumor en días alternos empezando el día 1 durante 5 días.

Los animales tratados con PBS o control de isotipo IgG tuvieron una supervivencia media de 13 días, mientras los ratones tratados con mAb 806 tuvieron un incremento de 61,5% en la supervivencia media de hasta 21 días ($P < 0,001$).

ES 2 334 494 T3

El tratamiento de los ratones a los 3 días de la implantación, tras el establecimiento del tumor, también prolongó la supervivencia media de los animales tratados con mAb 806 un 46,1% (de 13 días a 19 días; $P < 0,01$) en comparación con la de los grupos de control.

5 Para determinar si estos efectos antitumorales de mAb 806 se extendían más allá de los xenoinjertos U87MG. Δ EGFR, se administraron tratamientos similares a los animales que portaban otros xenoinjertos de células de glioma de LN-Z308. Δ EGFR y A 1207. Δ EGFR. La supervivencia media de los ratones tratados con mAb 806 que portaban xenoinjertos LN-Z308. Δ EGFR se prolongó de 19 días para los controles a 58 días ($P < 0,001$). Sorprendentemente, cuatro de ocho animales tratados con mAb 806 sobrevivieron más de 60 días. La supervivencia media de los animales que portaban xenoinjertos A1207. Δ EGFR también se prolongó de 24 días para los controles a 29 días ($P < 0,01$).

El Tratamiento con MAb 806 Inhibe el Crecimiento del Tumor de Cerebro que expresa en exceso Δ EGFR

15 Los ratones que portaban xenoinjertos U87MG. Δ EGFR y LN-Z308. Δ EGFR fueron sometidos a eutanasia el día 9 y el día 15, respectivamente. Las secciones de tumor se analizaron histopatológicamente y se determinaron los volúmenes de los tumores. Coincidiendo con los resultados observados para la supervivencia animal, el tratamiento con mAb 806 redujo significativamente los volúmenes en aproximadamente 90% de los xenoinjertos U87MG. Δ EGFR ($P < 0,001$) y LN-Z308. Δ EGFR en más de 95% ($P < 0,001$) en comparación con la de los grupos de control. Se obtuvieron resultados similares para los animales que portaban tumores A1207. Δ EGFR (reducción del volumen de 65%, $P < 0,01$).

El Tratamiento Intratumoral con mAb 806 Prolonga la Supervivencia de los Ratones que Portan Tumores de Cerebro U87MG. Δ EGFR

25 También se determinó la eficacia de la inyección intratumoral directa de mAb 806 para el tratamiento de xenoinjertos U87MG. Δ EGFR. Los animales recibieron inyecciones intratumorales de mAb 806 o control de isotipo IgG un día después de la implantación. Los animales de control sobrevivieron durante 15 días, mientras los ratones tratados con mAb 806 permanecieron vivos durante 18 días ($P < 0,01$). Si bien el tratamiento intratumoral con mAb 806 resultó algo eficaz, conllevó las dificultades de las múltiples inyecciones intracraneales y el incremento del riesgo de infección. Por lo tanto los autores de la presente invención se centraron en los tratamientos generalizados para estudios adicionales.

El Tratamiento con MAb 806 Prolonga Ligeramente la Supervivencia de Ratones que Portan Xenoinjertos Intracraneales U87MG.wtEGFR pero no U87MG o U87MG.DK

35 Para determinar si la inhibición de crecimiento por mAb 806 era selectiva para los tumores que expresan Δ EGFR, los autores de la presente invención trataron xenoinjertos cerebrales U87MG, U87MG.DK (Δ EGFR carente de quinasa) y U87MG.wtEGFR. El tratamiento con MAb 806 no prolongó la supervivencia de los ratones a los que se habían implantado tumores U87MG que expresaban un bajo nivel de EGFR de tipo salvaje endógeno (wtEGFR), o animales que portaban xenoinjertos U87MG.DK que expresaban en exceso Δ EGFR carente de quinasa además de un bajo nivel de wtEGFR endógeno. El tratamiento con mAb 806 prolongó ligeramente la supervivencia de los ratones que portaban tumores U87MG.wtEGFR ($P < 0,05$, supervivencia media 23 días frente a 26 días para los grupos de control) que expresaban wtEGFR en exceso.

La Reactividad de MAb 806 se Corresponde con la Eficacia Anti-tumoral In Vivo

45 Para comprender el efecto diferencial de mAb 806 sobre los tumores que expresan diferentes niveles o distintos tipos de EGFR, los autores de la presente invención determinaron la reactividad de mAb 806 con diferentes células tumorales mediante análisis FACS. Coincidiendo con los informes previos, el anticuerpo monoclonal anti-EGFR 528 reconocía tanto Δ EGFR como wtEGFR, y demostró una tinción más fuerte para las células U87MG. Δ EGFR en comparación con las células U87MG. En contraste, el anticuerpo EGFR.1 reaccionaba con wtEGFR pero no con Δ EGFR, ya que las células U87MG. Δ EGFR eran tan poco reactivas como las células U87MG. Este anticuerpo EGFR.1 reaccionaba con U87MG.wtEGFR más intensamente que con las células U87MG, ya que las células U87MG.wtEGFR expresaban en exceso wtEGFR. Si bien mAb 806 reaccionaba intensamente con las células U87MG. Δ EGFR y U87MG.DK y no con las células U87MG, éste reaccionaba débilmente con U87MG.wtEGFR, indicando que mAb 806 es selectivo para Δ EGFR con una reactividad cruzada débil con el wtEGFR expresado en exceso. Este nivel de reactividad con U87MG.wtEGFR era cuantitativamente y cualitativamente similar a la prolongación de la supervivencia mediada por el tratamiento con anticuerpo.

60 Los autores de la presente invención determinaron adicionalmente la especificidad de mAb 806 mediante inmunoprecipitación. Los EGFR de las diferentes líneas celulares fueron inmunoprecipitados con los anticuerpos 528, EGFR.1 y mAb 806. Después se sondearon las transferencias de las proteínas separadas electroforéticamente con el anticuerpo anti-EGFR C13, que reconoce wtEGFR y también Δ EGFR y DK. Coincidiendo con el análisis FACS el anticuerpo 528 reconoció wtEGFR y los receptores mutantes, mientras el anticuerpo EGFR.1 reaccionó con wtEGFR pero no con las especies mutantes. Por otra parte, los niveles de receptores mutantes en células U87MG. Δ EGFR y U87MG.DK son comparables con los de wtEGFR en células U87MG.wtEGFR. No obstante, el anticuerpo mAb 806 fue capaz de precipitar solamente una pequeña cantidad del wtEGFR de los productos lisados de células U87MG.wtEGFR en com-

paración con la cantidad más grande de receptor mutante precipitado de las células U87MG. Δ EGFR y U87MG.DK, y una cantidad no detectable de las células U87MG. Colectivamente, estos datos sugieren que mAb 806 reconoce un epítipo en Δ EGFR que también existe en una pequeña fracción de wtEGFR solamente cuando es expresado en exceso sobre la superficie celular.

5

El Tratamiento con MAb 806 Reduce la Autofosforilación de Δ EGFR y Regula a la Baja la Expresión de Bcl-X_L en Tumores cerebrales U87MG. Δ EGFR

Los autores de la presente invención investigaron los mecanismos subyacentes a la inhibición del crecimiento por mAb 806. Puesto que la actividad quinasa y la autofosforilación constitutivamente activa del extremo carboxilo de Δ EGFR son esenciales para sus funciones biológicas los autores de la presente invención determinaron el estado de fosforilación de Δ EGFR en tumores de animales tratados y de control. Se encontró que el tratamiento con mAb 806 reducía espectacularmente la autofosforilación de Δ EGFR, incluso aunque los niveles de receptor disminuyeran sólo ligeramente en los xenoinjertos tratados con mAb 806. Los autores de la presente invención han demostrado previamente que la autofosforilación del receptor ocasiona una regulación al alza del gen antiapoptótico, Bcl-X_L, que juega un papel clave en la reducción de la apoptosis de tumores que expresan en exceso Δ EGFR. Por lo tanto, los autores de la presente invención determinaron a continuación el efecto de mAb 806 sobre la expresión de Bcl-X_L. Los tumores Δ EGFR de los animales tratados con mAb 806 mostraron en efecto una reducción de los niveles de Bcl-X_L.

El Tratamiento con MAb 806 Disminuye el Crecimiento y la Angiogénesis, y Aumenta la Apoptosis en Tumores U87MG. Δ EGFR

A la luz de la supresión *in vivo* causada por el tratamiento con mAb 806 y sus efectos bioquímicos sobre la señalización del receptor, los autores de la presente invención determinaron la velocidad de proliferación de los tumores de ratones de control o tratados. El índice proliferativo, medido mediante tinción con Ki-67 de los tumores tratados con mAb 806, fue significativamente menor que el de los tumores de control ($P < 0,001$). Además, el análisis del índice apoptótico a través de la tinción con TLTNEL demostró un incremento significativo en el número de células apoptóticas en los tumores tratados con mAb 806 en comparación con los tumores de control ($P < 0,001$). También se analizó al grado de vascularización del tumor mediante inmunotinción de los tumores de los especímenes tratados y de control para CD31. Para cuantificar la vascularización del tumor, se midieron las zonas microvasculares (MVA) utilizando un análisis de imágenes por ordenador. Los tumores tratados con mAb 806 mostraron una MVA 30% menor que los tumores de control ($P < 0,001$). Para comprender si la interacción entre el receptor y el anticuerpo puede lograr una respuesta inflamatoria, los autores de la presente invención tiñeron secciones de tumor para el marcador de macrófagos, F4/80, y el marcador de células NK, asialo GM1. Los macrófagos se identificaron en toda la matriz tumoral y especialmente se acumularon cerca de la periferia del tumor U87MG. Δ EGFR tratado con mAb 86. Los autores de la presente invención observaron algunas células NK infiltradas y alrededor de los tumores y ninguna diferencia significativa entre los tumores tratados con mAb 806 y de control del isotipo.

40 Ejemplo 17

Inmunoterapia combinada con mAb806 y mAb528

Seguro que funciona. El ejemplo está en un formato algo diferente de los otros que le preceden.

45

Los experimentos mostrados en la presente memoria describen el trabajo *in vivo* diseñado para determinar la eficacia de los anticuerpos de acuerdo con esta invención.

Se utilizaron ratones hembra carentes de sistema inmunitario, de 4-6 semanas de edad, como animales experimentales. Los ratones recibieron inoculaciones subcutáneas de 3×10^6 células tumorales en cada uno de sus flancos.

50

Los animales recibieron células U87MG.D2-7, U87MG.DK, o A431, todos los cuales se han descrito, *supra*. La terapia comenzó cuando los tumores hubieron crecido hasta un tamaño suficiente.

Los ratones recibieron después inyecciones de uno de (i) solución salina tamponada con fosfato, (ii) mAb 806 (0,5 mg/inyección), (iii) mAb 528 (0,5 mg/inyección), o (iv) una combinación de ambos mAb. Con respecto a "(iv)", los diferentes grupos de ratones recibieron 0,5 mg/inyección de cada mAb, o 0,25 mg/inyección de cada mAb.

55

El primer grupo de ratones examinados fueron aquellos que habían recibido inyecciones de U87MG.D2-7. El protocolo de tratamiento comenzó 9 días después de la inoculación y continuó, 3 veces por semana durante 2 semanas (esto es, se inoculó a los animales 9, 11, 13, 16, 18 y 20 días después de que fueron inyectadas las células). Al comienzo del protocolo de tratamiento, el diámetro medio del tumor era de 115 mm³. Cada grupo contenía 50 ratones, cada uno con dos tumores.

60

En el grupo de ratones que recibieron la combinación de anticuerpos (0,5 mg/inyección de cada uno), se produjeron tres regresiones completas. No hubo regresiones en ninguno de los demás grupos. La Figura 18A muestra los resultados gráficamente.

65

En un segundo grupo de ratones, las sustancias fueron las mismas, excepto que la terapia combinada contenía 0,25 mg de cada anticuerpo por inyección. Las inyecciones se administraron 10, 12, 14, 17, 19 y 21 días después de la inoculación con las células. Al comienzo de la terapia el tamaño medio del tumor era de 114 mm³. Los resultados se muestran en la Figura 18B.

El tercer grupo de ratones recibió inoculaciones de U87MG.DK. Las inyecciones terapéuticas comenzaron 18 días después de la inoculación con las células, y continuó los días 20, 22, 25, 27 y 29. El tamaño medio del tumor al inicio del tratamiento era de 107 mm³. La Figura 18C resume los resultados. Las inyecciones terapéuticas fueron las mismas que en el primer grupo.

Finalmente, el cuarto grupo de ratones, a los que se habían inoculado las células A431, recibió inyecciones como en los grupos I y III, a los 8, 10, 12 y 14 días de la inoculación. Al inicio, el tamaño medio del tumor era de 71 mm³. Los resultados se muestran en la Figura 18D.

Los resultados indicaban que la terapia combinada con anticuerpos mostraba un efecto sinérgico en la reducción de tumores. Véase la Figura 18A. Se observó un efecto similar a una dosis inferior, Figura 18B, indicando que el efecto no se debe simplemente a los niveles de dosificación.

La terapia combinada no inhibió el crecimiento de U87MG.DK (Figura 18C), indicando que la función inmunitaria del anticuerpo no era la causa del descenso observado en las Figuras 18A y 18B.

Se observa que, como se muestra en la Figura 18D, la terapia combinada también mostraba una eficacia sinérgica sobre los tumores A431, con 4 dosis que conducían a la tasa de respuesta completa del 60%. Estos datos sugieren que la molécula de EGFR reconocida por mAb806 es funcionalmente diferente de la inhibida por 528.

Referencias

1. **Wikstrand, C. J., McLendon, R. E., Friedman, A. H., y Bigner, D. D.** Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII, *Cancer Res.* 57: 4130-40, 1997.

2. **Olapade-Olaopa, E. O., Moscatello, D. K., MacKay, E. H., Horsburgh, T., Sandhu, D. P., Terry, T. R., Wong, A. J., y Habib, F. K.** Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer, *Br J Cancer.* 82: 186-94, 2000.

3. **Wikstrand, C. J., Hale, L. P., Batra, S. K., Hill, M. L., Humphrey, P. A., Kurpad, S. N., McLendon, R. E., Moscatello, D., Pegram, C. N., Reist, C. J., y et al.** Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas, *Cancer Res.* 55: 3140-8, 1995.

4. **García de Palazzo, I. E., Adams, G. P., Sundareshan, P., Wong, A. J., Testa, J. R., Bigner, D. D., y Weiner, L. M.** Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas, *Cancer Res.* 53: 3217-20, 1993.

5. **Ekstrand, A. J., Sugawa, N., James, C. D., y Collins, V. P.** Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- y/o C-terminal tails, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 4309-13, 1992.

6. **Wong, A. J., Ruppert, J. M., Bigner, S. H., Grzeschik, C. H., Humphrey, P. A., Bigner, D. S., y Vogelstein, B.** Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 2965-9, 1992.

7. **Yamazaki, H., Ohba, Y., Tamaoki, N., y Shibuya, M.** A deletion mutation within the ligand binding domain is responsible for activation of epidermal growth factor receptor gene in human brain tumors, *Jpn J Cancer Res.* 81: 773-9, 1990.

8. **Yamazaki, H., Fukui, Y., Ueyama, Y., Tamaoki, N., Kawamoto, T., Taniguchi, S., y Shibuya, M.** Amplification of the structurally and functionally altered epidermal growth factor receptor gene (c-erbB) in human brain tumors, *Mol Cell Biol.* 8: 1816-20, 1988.

9. **Sugawa, N., Ekstrand, A. J., James, C. D., y Collins, V. P.** Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 8602-6, 1990.

10. **Nishikawa, R., Ji, X. D., Harmon, R. C., Lazar, C. S., Gill, G. N., Cavenee, W. K., y Huang, H. J.** A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 7727-31, 1994.

11. **Batra, S. K., Castelino-Prabhu, S., Wikstrand, C. J., Zhu, X., Humphrey, P. A., Friedman, H. S., y Bigner, D. D.** Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene, *Cell Growth Differ.* 6: 1251-9, 1995.
- 5 12. **Nagane, M., Coufal, F., Lin, H., Bogler, O., Cavenee, W. K., y Huang, H. J.** A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis, *Cancer Res.* 56: 5079-86, 1996.
- 10 13. **Wikstrand, C. J., Reist, C. J., Archer, G. E., Zalutsky, M. R., y Bigner, D. D.** The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target, *J Neurovirol.* 4: 148-58, 1998.
- 15 14. **Humphrey, P. A., Wong, A. J., Vogelstein, B., Zalutsky, M. R., Fuller, G. N., Archer, G. E., Friedman, H. S., Kwatra, M. M., Bigner, S. H., y Bigner, D. D.** Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 4207-11, 1990.
- 20 15. **Okamoto, S., Yoshikawa, K., Obata, Y., Shibuya, M., Aoki, S., Yoshida, J., y Takahashi, T.** Monoclonal antibody against the fusion junction of a deletion-mutant epidermal growth factor receptor, *Br J Cancer.* 73: 1366-72, 1996.
- 25 16. **Hills, D., Rowlinson-Busza, G., y Gullick, W. J.** Specific targeting of a mutant, activated EGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody, *Int J Cancer.* 63: 537-43, 1995.
- 30 17. **Moscatello, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P. W., Biegel, J. A., Hayes, R. L., y Wong, A. J.** Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors, *Cancer Res.* 55: 5536-9, 1995.
- 35 18. **Baselga, J., Pfister, D., Cooper, M. R., Cohen, R., Burtness, B., Bos, M., D'Andrea, G., Seidman, A., Norton, L., Gunnett, K., Falcey, J., Anderson, V., Waksal, H., y Mendelsohn, J.** Phase I Studies of Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Chimeric Antibody C225 Alone and in Combination With Cisplatin, *J Clin Oncol.* 18: 904, 2000.
- 40 19. **Faillot, T., Magdelenat, H., Mady, E., Stasiecki, P., Fohanno, D., Gropp, P., Poisson, M., y Delattre, J. Y.** A phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas, *Neurosurgery.* 39: 478-83, 1996.
- 45 20. **Ponten, J. y Macintyre, E. H.** Long term culture of normal and neoplastic human glia, *Acta Pathol Microbiol Scand.* 74: 465-86, 1968.
- 50 21. **Masui, H., Kawamoto, T., Sato, J. D., Wolf, B., Sato, G., y Mendelsohn, J.** Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies, *Cancer Res.* 44: 1002-7, 1984.
- 55 22. **Domagala, T., Konstantopoulos, N., Smyth, F., Jorissen, R. N., Fabri, L., Geleick, D., Lax, I., Schlessinger, J., Sawyer, W., Howlett, G. J., Burgess, A. W., y Nice, E. C.** Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between Epidermal Growth Factor (EGF) and the Extracellular Domain of the EGF receptor., *Growth Factors.* 18: 11-29, 2000.
- 60 23. **Lindmo, T., Boven, E., Cuttitta, F., Fedorko, J., y Bunn, P. A., Jr.** Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess, *J Immunol Methods.* 72: 77-89, 1984.
- 65 24. **Huang, H. S., Nagane, M., Klingbeil, C. K., Lin, H., Nishikawa, R., Ji, X. D., Huang, C. M., Gill, G. N., Wiley, H. S., y Cavenee, W. K.** The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine fosforylation and unattenuated signaling, *J Biol Chem.* 272: 2927-35, 1997.
25. **Reist, C. J., Archer, G. E., Wikstrand, C. J., Bigner, D. D., y Zalutsky, M. R.** Improved targeting of an anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody in tumor xenografts after labeling using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate, *Cancer Res.* 57: 1510-5, 1997.
26. **Santon, J. B., Cronin, M. T., MacLeod, C. L., Mendelsohn, J., Masui, H., y Gill, G. N.** Effects of epidermal growth factor receptor concentration on tumorigenicity of A431 cells in nude mice, *Cancer Res.* 46: 4701-5, 1986.
27. **Voldborg, B. R., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M., y Poulsen, H. S.** Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials, *Ann Oncol.* 8: 1197-206, 1997.

28. den **Eynde**, B. y **Scott**, A. M. Tumor Antigens. In: P. J. Delves y I. M. Roitt (eds.), *Encyclopedia of Immunology*, Second Edition, pp. 2424-31. London: *Academic Press*, 1998.
29. **Seymour**, L. Novel anti-cancer agents in development: exciting prospects and new challenges, *Cancer Treat Rev.* 25: 301-12, 1999.
30. **Sturgis**, E. M., **Sacks**, P. G., **Masui**, H., **Mendelsohn**, J., y **Schantz**, S. P. Effects of antiepidermal growth factor receptor antibody 528 on the proliferation and differentiation of head and neck cancer, *Otolaryngol Head Neck Surg.* 111: 633-43, 1994.
31. **Goldstein**, N. I., **Prewett**, M., **Zuklys**, K., **Rockwell**, P., y **Mendelsohn**, J. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model, *Clin Cancer Res.* 1: 1311-8, 1995.
32. **Reist**, C. J., **Archer**, G. E., **Kurpad**, S. N., **Wikstrand**, C. J., **Vaidyanathan**, G., **Willingham**, M. C., **Moscato**, D. K., **Wong**, A. J., **Bigner**, D. D., y **Zalutsky**, M. R. Tumor-specific anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibodies: use of the tyramine-cellobiose radioiodination method enhances cellular retention and uptake in tumor xenografts, *Cancer Res.* 55: 4375-82, 1995.
33. **Reist**, C. J., **Garg**, P. K., **Alston**, K. L., **Bigner**, D. D., y **Zalutsky**, M. R. Radioiodination of internalizing monoclonal antibodies using N- succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate, *Cancer Res.* 56: 4970-7, 1996.
34. **Press**, O. W., **DeSantes**, K., **Anderson**, S. K., y **Geissler**, F. Inhibición de catabolismo de radiolabelados anticuerpos por células tumorales usando aminas lisosomotropas y carboxilatos ionoforos, *Cancer Res.* 50: 1243-50, 1990.
35. **Reist**, C. J., **Batra**, S. K., **Pegram**, C. N., **Bigner**, D. D., y **Zalutsky**, M. R. *In vitro* y *in vivo* comportamiento de anticuerpo quimérico anti-EGFRvIII monoclonal: comparación con su padre murino, *Nucl Med Biol.* 24: 639-47, 1997.
36. **Mineo**, C., **Gill**, G. N., y **Anderson**, R. G. Regulada migración de receptor de factor de crecimiento epidérmico de la caveola, *J Biol Chem.* 274: 30636-43, 1999.
37. **Gunther**, N., **Betzel**, C., y **Weber**, W. La forma secretada del receptor de factor de crecimiento epidérmico. Caracterización y cristalización del complejo receptor-ligando, *J Biol Chem.* 265: 22082-5, 1990.

Ejemplo 18

Anticuerpo monoclonal novedoso para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) de2-7 que también reconoce el EGFR expresado en células que contienen la amplificación del gen EGFR

Los siguientes experimentos fueron presentados por Johns *et al*, (2002) *Int. J. Cancer*, 98, y en la solicitud pendiente Núm. de Serie 60/342,258 presentada el 21 de Diciembre de 2001, cuyas descripciones completas se incorporan en la presente memoria como referencia con referencia cruzada las Figuras de la presente memoria cuando sea apropiado. Se estudió el anticuerpo monoclonal mAb 806 y se desarrollaron datos adicionales respecto a sus características de unión en cuanto al receptor EGFR, que se añaden y corroboran los datos presentados antes en la presente memoria. Por consiguiente, lo que sigue representa una revisión y una presentación del material mostrado en la solicitud de patente y la correspondiente publicación.

El anticuerpo monoclonal (MAb 806) supera potencialmente las dificultades asociadas con la localización del EGFR expresado sobre la superficie de las células tumorales. El MAb 806 se unía a las células de glioma U87MG transfectadas con de2-7 EGFR (U87MG.Δ2-7) con una elevada afinidad ($\sim 1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$), pero no se unían a las células parentales que expresaban el EGFR de tipo salvaje. Coincidiendo con esta observación, el MAb 806 no era capaz de unirse a una versión soluble del EGFR de tipo salvaje que contenía el dominio extracelular. En contraste, la inmovilización de este dominio extracelular a placas ELISA indujo la saturación y la unión en respuesta a la dosis de MAb 806, sugiriendo que MAb 806 se puede unir al EGFR de tipo salvaje EGFR en ciertas condiciones. El MAb 806 también se unía a la superficie de las células A431, que debido a la amplificación del gen EGFR expresan grandes cantidades de EGFR. De manera interesante, el MAb 806 solamente reconocía un 10% de las moléculas de EGFR totales expresadas por las células A431 y la afinidad de unión era menor que la determinada para de2-7 EGFR. El MAb 806 localizaba específicamente los xenoinjertos U87MG.Δ2-7 y A431 desarrollados en ratones carentes de sistema inmunitario con niveles máximos en los xenoinjertos U87MG.Δ2-7 detectados 8 h después de la inyección. No se observó localización específica de los xenoinjertos U87MG parentales. Después de la unión a las células U87MG.Δ2-7, el MAb 806 fue rápidamente internalizado por macropinositosis y transportado con posterioridad a lisosomas, un procedimiento que contribuye probablemente al rápido máximo de localización observado en los xenoinjertos. De este modo, el MAb 806 puede ser utilizado para localizar células tumorales que contienen la amplificación del gen EGFR o de2-7 EGFR pero no se une al EGFR de tipo salvaje cuando es expresado sobre la superficie de la célula.

Como se ha comentado antes, el MAb 806 es específico para de2-7 EGFR aunque se une a un epítipo distinto del péptido de empalme único. De manera interesante, si bien MAb 806 no reconocía el EGFR de tipo salvaje expresado sobre la superficie celular de las células de glioma, se unía al dominio extracelular del EGFR de tipo salvaje inmovilizado sobre la superficie de placas ELISA. Además, el MAb 806 se unía a la superficie de las células A431, que tienen una amplificación del gen EGFR pero no expresan el de2-7 EGFR. Por lo tanto, es posible que MAb 806 pueda ser utilizado para localizar específicamente tumores con EGFR amplificado con independencia de su estado de de2-7 EGFR, aunque los resultados de los autores de la presente invención sugieren que los tumores que expresan simultáneamente el receptor mutado mostrarían todavía una localización preferente. Puesto que MAb 806 no se une al receptor de tipo salvaje en ausencia de amplificación génica, no habría absorción en el tejido normal, un problema potencial asociado con los anticuerpos para EGFR que están siendo desarrollados en la actualidad.^{18,19}

Materiales y métodos

MAB y líneas celulares

La línea celular de astrocitoma U87MG ha sido descrita con detalle previamente.²⁰ Esta línea celular fue infectada con un retrovirus que contenía el de2-7 EGFR para producir la línea celular U87MG.A2-7. Se obtuvieron 10 células A431 de carcinoma escamoso de ATCC (Rockville, MD). Estas líneas celulares se cultivaron en DMEM/F-12 con GlutaMAX™ (Life Technologies, Melbourne, Australia) con un suplemento con FCS al 10% (CSL, Melbourne, Australia). La línea celular pro-B murina BaF/3, que no expresa ninguna de las moléculas relacionadas con EGFR conocidas, fue transfectada con de2-7 EGFR como se ha descrito antes. El anticuerpo DH8.3 (IgG1) ha sido descrito previamente y fue obtenido después de la inmunización de ratones con el péptido de empalme único encontrado en de2-7 EGFR.¹⁶ Se produjo MAb 806 (IgG2b) después de la inmunización de ratones con fibroblastos de ratón NR6 transfectados con de2-7 EGFR. Este se seleccionó para su caracterización adicional ya que los análisis de hemaglutinación mostraron un elevado título frente a células NR6.ΔEGFR pero bajos fondos en células NR6.wtEGFR. El anticuerpo 528, que reconoce EGFR tanto de2-7 como de tipo salvaje, ha sido descrito previamente²¹ y fue producido en Biological Production Facility (Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne) utilizando un hibridoma obtenido de ATCC. El anticuerpo policlonal sc-03 dirigido al dominio COOH-terminal del EGFR fue adquirido de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

Otros reactivos

El dominio extracelular recombinante (aminoácidos 1-621) del EGFR de tipo salvaje (sEGFR) fue producido como se ha descrito previamente.²² El péptido de empalme único biotilado (Biotina-LEEKKGNVVTDH) de de2-7 EGFR fue sintetizado mediante la química de Fmoc convencional y su pureza fue determinada (>96%) mediante HPLC de fase inversa y análisis de espectro de masas (Auspep, Melbourne, Australia).

Análisis FACS

Las células se marcaron con el anticuerpo relevante (10 µg/ml) seguido de IgG anti-ratón de cabra conjugada con fluoresceína (dilución 1:100; Calbiochem, San Diego, CA). Los datos de FACS se obtuvieron en un Coulter Epics Elite ESP observando un mínimo de 5.000 eventos y se analizaron utilizando EXPO (versión 2) para Windows.

Análisis ELISA

Se utilizaron dos tipos de ELISA para determinar la especificidad de los anticuerpos. En el primer análisis, las placas se recubrieron con Segfr (10 µg/ml en tampón carbonato 0,1 M pH 9,2) durante 2 hr y después se bloquearon con albúmina de suero humano al 2% (HSA) en PBS. Los anticuerpos se añadieron a los pocillos por triplicado a una concentración creciente en HSA al 2% en solución salina tamponada con fosfato (PBS). El anticuerpo unido se detectó mediante IgG anti-ratón de oveja conjugada con peroxidasa de rábano picante (Silenus, Melbourne, Australia) utilizando ABTS (Sigma, Sydney, Australia) como sustrato y se midió la absorbancia a 405 nm. En el segundo análisis, el péptido específico de de2-7 biotilado se unió a placas ELISA previamente recubiertas con estreptavidina (Pierce, Rockford, Illinois). Los anticuerpos se unieron y se detectaron como en el primer análisis.

Análisis Scatchard

Se marcaron los anticuerpos con I¹²⁵ (Amrad, Melbourne, Australia) mediante el método de la cloramina T y se determinó la inmunoreactividad mediante el análisis de Lindmo.²³ Todos los análisis de unión se realizaron en HSA/PBS al 1% en 1-2 X 10⁶ células U87MG.Δ2-7 o A431 vivas durante 90 min a 4°C con rotación suave. Se utilizó una concentración establecida de 10 ng/ml de anticuerpo marcado con I¹²⁵ en presencia de concentraciones crecientes del anticuerpo no marcado apropiado. Se determinó la unión no específica en presencia de un exceso de 10.000 veces de anticuerpo no marcado. Ni el Mab 806 radiomarcado con I¹²⁵ ni el anticuerpo DH8.3 se unían a las células U87MG parentales. Una vez completada la incubación, las células se lavaron y se contó el anticuerpo marcado con I¹²⁵ unido utilizando un contador gamma COBRA II (Packard Instrument Company, Meriden, CT). El análisis Scatchard se realizó tras la corrección para la inmunoreactividad.

Análisis de Internalización

Las células U87MG.Δ2-7 se incubaron con MAb 806 o anticuerpo DH8.3 (10 μg/ml) durante 1 hr en DMEM a 4°C. Después de lavar, las células se transfirieron a DMEM pre-calentado a 37°C y se tomaron alícuotas en diversos momentos puntuales después de la incubación a 37°C. La internalización se detuvo lavando inmediatamente las alícuotas con tampón de lavado enfriado con hielo (HSA/PBS al 1%). Una vez completado el tiempo las células se tiñeron mediante FACS como se ha descrito antes. Se calculó el porcentaje de internalización comparando la tinción del anticuerpo en superficie en diferentes momentos puntuales con el tiempo cero utilizando la fórmula: porcentaje de anticuerpo internalizado = (fluorescencia media a tiempo_x - fluorescencia del fondo)/(fluorescencia media a tiempo₀ - fluorescencia del fondo) X 100. Este método se validó en 1 análisis utilizando anticuerpo yodado (MAb 806) para medir la internalización como se ha descrito previamente.²⁴ Las diferencias en la tasa de internalización en diferentes momentos puntuales se compararon utilizando el test de la t de Student.

Microscopía Electrónica de Células U87MG.Δ2-7

Se hicieron crecer células U87MG.Δ2-7 sobre portas con cámaras recubiertas de gelatina (Nunc, Naperville, IL) a una confluencia del 80% y después se lavaron con DMEM enfriado con hielo. Después las células se incubaron con MAb 806 o anticuerpo DH8.3 en DMEM durante 45 min a 4°C. Después de lavar, las células se incubaron durante 30 min adicionales con IgG anti-ratón conjugada con partículas de oro (partículas de 20 nm) (BBInternational, Cardiff, UK) a 4°C. Tras un lavado adicional, se añadió DMEM/FCS al 10% precalentado a las células, que se incubaron a 37°C varias veces de 1-60 min. La internalización del anticuerpo se detuvo con medio enfriado con hielo y las células se fijaron con glutaraldehído al 2,5% en PBS/HSA al 0,1% y después se post-fijaron en tetróxido de osmio al 2,5%. Después de la deshidratación a través de una serie graduada de acetona, las muestras se embebieron en resina Epon/Araldite, se cortaron en secciones ultrafinas con un microtomo Reichert Ultracut-S (Leica) y se recogieron sobre gradillas de níquel. Las secciones se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo antes de ser visualizadas en un microscopio electrónico de transmisión Philips CM12 a 80 kV. Se realizó el análisis estadístico de los granos de oro contenidos en las fósitas recubiertas utilizando un test de χ^2 .

Estudios de Inmunoprecipitación

Las células se marcaron durante 16 hr con 100 μCi/ml de Tran³⁵S-Label (ICN Biomedicals, CA) en DMEM sin metionina/cisteína con un suplemento de FCS al 5% sometido a diálisis. Después de lavar con PBS, las células se colocaron en tampón de lisis (Triton X-100 al 1%, HEPES 30 mM, NaCl 150 mM, AEBSF 500 μM, aprotinina 150 nM, inhibidor de proteasa E-64 1 μM, EDTA 0,5 mM y leupeptina 1 μM, pH 7,4) durante 1 hr a 4°C. Los productos lisados se aclararon mediante centrifugación durante 10 min a 12.000 g, después se incubaron con 5 μg de anticuerpo apropiado durante 30 min a 4°C antes de la adición de Proteína A-Sefarosa. Los productos inmunoprecipitados se lavaron 3 veces con tampón de lisis, se mezclaron con tampón de muestra SDS, se separaron mediante electroforesis en gel utilizando un gel de Tris/glicina al 4-20% que después se secó y se expuso a película de rayos X.

Biodistribución ratones carentes de sistema inmunitario que portan tumores

Se establecieron xenoinjertos de tumores en ratones BALB/c carentes de sistema inmunitario mediante inyección s.c. de 3 X 10⁶ células U87MG, U87MG.Δ2-7 o A431. La expresión de de2-7 EGFR en xenoinjertos U87MG.Δ2-7 permanece estable durante todo el periodo de biodistribución como se medía mediante inmunohistoquímica en diferentes momentos puntuales (datos no mostrados). Las células A431 también conservaron su reactividad con MAb 806 cuando se hacían crecer como xenoinjertos tumorales mediante inmunohistoquímica. Se inyectaron las células U87MG o A431 en 1 lado 7-10 días antes de que las células U87MG.Δ2-7 fueran inyectadas en el otro lado debido a la tasa de crecimiento más rápido observada para los xenoinjertos que expresaban de2-7 EGFR. Los anticuerpos fueron radiomarcados y evaluados en cuanto a la inmunorreactividad como se ha descrito antes y se inyectaron en ratones por la ruta retro-orbital cuando los tumores tenían 100-200 mg de peso. Cada ratón recibió 2 anticuerpos diferentes (2 μg por anticuerpo): 2 μCi de MAb 806 marcado con I¹²⁵ y 2 μCi de DH8.3 o 528 marcados con I¹³¹. A menos que se indique, se sacrificaron grupos de 5 ratones en diferentes momentos puntuales post-inyección y se obtuvo sangre mediante punción cardíaca. Los tumores, hígado, bazo, riñones y pulmones se obtuvieron por disección. Todos los tejidos se pesaron y se analizaron en cuanto a la actividad I¹²⁵ e I¹³¹ utilizando una ventana de recuento de dos canales. Los datos se expresaron para cada anticuerpo como el porcentaje de dosis inyectada por gramo de tumor (% DI/g de tumor) determinado mediante comparación con los patrones de dosis inyectada o se convirtieron en razones de sangre/hígado (esto es, % DI/g tumor ÷ % DI/g sangre o hígado). Se analizaron las diferencias entre los grupos mediante un test de la t de Student. Tras la inyección de MAb 806 radiomarcado, algunos tumores se fijaron en formalina, se embebieron en parafina, se cortaron en secciones de 5 μm y después se expusieron a película de rayos x (AGFA, Mortsel, Bélgica) para determinar la localización de anticuerpo mediante autorradiografía.

*Resultados**Unión de anticuerpos a líneas celulares*

Con el fin de confirmar la especificidad de MAb 806 y del anticuerpo DH8.3, se analizó la unión a células U87MG y U87MG.Δ2-7 mediante FACS. Se incluyó una IgG2b murina irrelevante como control de isotipo para MAb 806 y el 528 ya que reconoce el EGFR tanto de2-7 como de tipo salvaje. Solamente el anticuerpo 528 fue capaz de teñir la línea

celular U87MG (Figura 1) coincidiendo con informes previos que demostraban que estas células expresan el EGFR de tipo salvaje.¹⁰ Tanto MAb 806 como el anticuerpo DH8.3 tenían niveles de unión similares a los del anticuerpo irrelevante, demostrando claramente que son incapaces de unirse al receptor de tipo salvaje (Figura 1). La unión del anticuerpo de control del isotipo a las células U87MG.Δ2-7 fue similar a la observada para las células U87MG. MAb 806 y el anticuerpo DH8.3 inmunotñieron las células U87MG.Δ2-7, indicando que estos anticuerpos reconocen específicamente el de2-7 EGFR (Figura 1). El anticuerpo 528 tiñó U87MG.Δ2-7 con una intensidad mayor que las células parentales ya que se une a los receptores tanto de2-7 como de tipo salvaje que son expresados simultáneamente en estas células (Figura 1). En gran medida, MAb 806 también se unía a la línea celular BaF/3.Δ2-7, demostrando que la expresión simultánea del EGFR de tipo salvaje no es un requerimiento para la reactividad de MAb 806 (Figura 1 datos no mostrados sin embargo en la presente memoria).

Unión de anticuerpos en análisis ELISA

Para caracterizar adicionalmente la especificidad de MAb 806 y el anticuerpo DH8.3, se examinó su unión mediante ELISA. Tanto MAb 806 como el anticuerpo 528 presentaron curvas de unión dependientes de la dosis y saturantes para sEGFR de tipo salvaje inmovilizado (Figura 2A). Como el único péptido de empalme encontrado en el de2-7 EGFR no está contenido en el sEGFR, MAb 806 se debe estar uniendo a un epítipo localizado en la secuencia de EGFR de tipo salvaje. La unión del anticuerpo 528 era probablemente inferior a la observada para MAb 806 ya que reconoce un determinante conformacional. Como se esperaba el anticuerpo DH8.3 no se unía al sEGFR de tipo salvaje ni siquiera a concentraciones de hasta 10 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 2A). Aunque sEGFR en solución inhibía la unión del anticuerpo 528 a sEGFR inmovilizado de una manera dependiente de la dosis, no era capaz de inhibir la unión de MAb 806 (Figura 2B). Esto sugiere que MAb 806 solo se puede unir al EGFR de tipo salvaje una vez inmovilizado sobre placas de ELISA, un procedimiento que puede inducir cambios conformacionales. Se observaron resultados similares utilizando BIAcore por medio del cual MAb 806 se unía a un sEGFR inmovilizado pero MAb 806 inmovilizado no se podía unir a sEGFR en solución (datos no mostrados). Después de la desnaturalización por calentamiento durante 10 min a 95°C, el sEGFR en solución fue capaz de inhibir la unión de MAb 806 a sEGFR inmovilizado (Figura 2C datos no mostrados sin embargo en la presente memoria), confirmando que MAb 806 se puede unir al EGFR de tipo salvaje en ciertas condiciones. De manera interesante, el sEGFR desnaturalizado fue incapaz de inhibir la unión del anticuerpo 528 (Figura 2C datos no mostrados sin embargo en la presente memoria), demostrando que este anticuerpo reconoce un epítipo conformacional. El anticuerpo DH8.3 mostró una unión dependiente de la dosis y saturable al único péptido de2-7 EGFR (Figura 2D). Ni MAb 806 ni el anticuerpo 528 se unieron al péptido, ni siquiera a concentraciones mayores que las utilizadas para obtener la unión por saturación de DH8.3, indicando adicionalmente que MAb 806 no reconoce un determinante epitópico en este péptido.

Análisis Scatchard de los anticuerpos

Se realizó un análisis Scatchard utilizando células U87MG.Δ2-7 con el fin de determinar la afinidad relativa de cada anticuerpo. Tanto MAb 806 como el anticuerpo DH8.3 conservaron una inmunorreactividad elevada cuando se yodaron y era típicamente mayor del 90% para MAb 806 y del 45-50% para el anticuerpo DH8.3. MAb 806 tenía una afinidad por el receptor de2-7 EGFR de $1,1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ mientras la afinidad de DH8.3 fue una 10 veces menor a $1,0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Ni el anticuerpo yodado unido a células parentales U87MG. MAb 806 reconocía una media de $2,4 \times 10^5$ sitios de unión por célula uniéndose el anticuerpo DH8.3 a una media de $5,2 \times 10^5$ sitios. De este modo, no solo hubo una buena coincidencia en el número de receptores entre los anticuerpos, sino también con un informe previo que mostraba $2,5 \times 10^5$ receptores de2-7 por célula medidos mediante un anticuerpo de2-7 EGFR diferente específico en la misma línea celular.²⁵

Internalización de anticuerpos por células U87MG.Δ2-7

La tasa de internalización de anticuerpo después de la unión a una célula diana influye tanto en sus propiedades de localización del tumor como en sus opciones terapéuticas. Por consiguiente, los autores de la presente invención examinaron la internalización of MAb 806 y el anticuerpo DH8.3 después de la unión a las células U87MG.Δ2-7 mediante FACS. Ambos anticuerpos mostraron una internalización relativamente rápida alcanzando niveles en el estado estacionario a los 10 min para MAb 806 y 30 min para DH8.3 (Figura 3). La internalización de DH8.3 era significativamente mayor tanto en términos de tasa (80,5% de DH8.3 internalizado a los 10 min en comparación con el 36,8% para MAb 806, $p < 0,01$) como de cantidad total internalizada a los 60 min (93,5% vs. 30,4%, $p < 0,001$). MAb 806 mostró niveles ligeramente inferiores de internalización a los 30 y 60 min en comparación con los 20 min en los 4 análisis realizados (Figura 3). Este resultado también se confirmó utilizando un análisis de internalización basado en MAb 806 yodado (datos no mostrados).

Análisis de microscopía electrónica de la internalización de anticuerpos

Dada esta diferencia en las tasas de internalización entre los anticuerpos, se realizó un análisis detallado del tráfico intracelular de anticuerpos utilizando la microscopía electrónica. Aunque el anticuerpo DH8.3 se internalizó predominantemente por medio de fosisitas recubiertas (Figura 19A), MAb 806 parecía ser internalizado mediante macropinocitosis (Figura 19B). De hecho, un análisis detallado de 32 fosisitas recubiertas formadas en células incubadas con MAb 806 reveló que ninguna de ellas contenía anticuerpo. En contraste, alrededor del 20% de todas las fosisitas recubiertas de las células incubadas con DH8.3 fueron positivas para el anticuerpo, conteniendo algunas múltiples granos de oro. Un análisis estadístico del número total de granos de oro contenidos en las fosisitas recubiertas descubrió que

la diferencia era altamente significativa ($p < 0,01$). Después de 20-30 min ambos anticuerpos pudieron ser observados en estructuras que morfológicamente se asemejaban a lisosomas (Figura 19C). La presencia de desechos celulares en estas estructuras también coincide con su naturaleza lisosómica.

5 *Biodistribución de anticuerpos en ratones carentes de sistema inmunitario que portan tumores*

Se comparó la biodistribución de MAb 806 y del anticuerpo DH8.3 en ratones carentes de sistema inmunitario que contenían xenoinjertos U87MG en 1 lado y xenoinjertos U87MG.Δ2-7 en el otro. Se seleccionó un período de tiempo relativamente corto para este estudio ya que un informe previo demostró que el anticuerpo DH8.3 muestra niveles máximos de localización tumoral entre las 4-24 hr.¹⁶ En términos de % DI/g de tumor, MAb 806 alcanzó su nivel máximo en xenoinjertos U87MG.Δ2-7 de 18,6% DI/g de tumor a las 8 hr (Figura 4A), considerablemente mayor que cualquier otro tejido excepto la sangre. Aunque DH 8.3 también mostró niveles tumorales máximos a las 8 hr, el nivel fue estadísticamente inferior ($p < 0,001$), 8,8% DI/g de tumor en comparación con MAb 806 (Figura 4B). Los niveles de ambos anticuerpos disminuyeron lentamente a las 24 y 48 hr. La autorradiografía de secciones de tejido con xenoinjerto U87MG.Δ2-7 recogidas 8 hr después de la inyección con MAb 806 solo marcado con I^{125} , ilustra claramente la localización por el anticuerpo de tumor viable (Figura 20). Ningún anticuerpo mostró una localización específica de los xenoinjertos parentales U87MG (Figura 4A, 4B). Con respecto a las razones de sangre/hígado, MAb 806 mostró la razón más alta a las 24 hr tanto para sangre (razón de 1,3) como hígado (razón de 6,1) (Figura 5A, 5B). El anticuerpo DH8.3 tenía su razón más alta en sangre a las 8 hr (razón de 0,38) y a las 24 hr en hígado (razón de 1,5) (Figura 5A, 5B), ambas las cuales son considerablemente inferiores que los valores obtenidos para MAb 806.

Unión de MAb 806 a células que contienen EGFR amplificado

Para examinar si MAb 806 podía reconocer el EGFR expresado en células que contienen un gen de receptor amplificado, se analizó su unión a células A431. Se observó una unión de MAb 806 a células A431 baja pero muy reproducible mediante análisis FACS (Figura 6). El anticuerpo DH8.3 no se unía a las células A431, indicando que la unión de MAb 806 no era resultado del bajo nivel de expresión de de2-7 EGFR (Figura 6). Como se esperaba, el anticuerpo anti-EGFR 528 mostraba una tinción fuerte de las células A431 (Figura 6). La media de 3 de tales experimentos dio un valor para la afinidad de $9,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ con $2,4 \times 10^5$ receptores por célula. De este modo la afinidad para este receptor fue unas 10 veces menor que la afinidad para de2-7 EGFR. Además, MAb 806 parece reconocer solamente una pequeña porción de EGFR encontrada en la superficie de las células A431. Utilizando el anticuerpo 528 se midieron aproximadamente 2×10^6 receptores por célula, lo que coincide con otros numerosos estudios.²⁶ Para asegurar que estos resultados no estaban restringidos simplemente a la línea celular A431, se examinó la reactividad MAb 806 en otras dos líneas celulares que mostraban amplificación del gen EGFR. Se ha informado de que tanto la línea celular de cáncer de cabeza y cuello HN5²⁷ como la línea celular de cáncer de mama MDA-468²⁸ contienen múltiples copias del gen EGFR. Coincidiendo con estos informes, el anticuerpo 528 presentó una tinción intensa de ambas líneas celulares (Figura 21). Como con la línea celular A431, el MAb 806 tiñó claramente ambas líneas celulares pero a un nivel inferior que el observado con el anticuerpo 528 (Figura 21). De este modo, la unión de MAb 806 no está simplemente restringida a las células A431 si no que parece ser una observación general para las células que contienen la amplificación del gen EGFR.

Inmunoprecipitaciones

Se caracterizó adicionalmente la reactividad de MAb 806 mediante inmunoprecipitación utilizando células marcadas con S^{35} . El anticuerpo sc-03 (un anticuerpo policlonal comercial específico para el dominio c-terminal del EGFR) inmunoprecipitó 3 bandas de células U87MG.Δ2-7; un doblete correspondiente a las 2 bandas de de2-7 EGFR observadas en estas células y una banda de peso molecular superior correspondiente al wt EGFR (Figura 22). En contraste, si bien MAb 806 inmunoprecipitaba las 2 bandas de de2-7 EGFR, el wt EGFR estaba completamente ausente. El anticuerpo sc-03 inmunoprecipitaba una única banda correspondiente al wt EGFR de las células A431 (Figura 22). El MAb 806 también inmunoprecipitaba una única banda correspondiente al wt EGFR de células A431 (Figura 22) pero coincidente con los datos de FACS y Scatchard, la cantidad de EGFR inmunoprecipitado por MAb 806 fue sustancialmente menor que el EGFR total presente sobre la superficie de la célula. Dado que el MAb 806 y el sc-03 inmunoprecipitaban cantidades similares de de2-7 EGFR, este resultado apoya la idea de que el anticuerpo MAb 806 solamente reconoce una porción del EGFR de las células que expresan en exceso el receptor. Una IgG2b irrelevante (un control del isotipo para MAb 806) no inmunoprecipitó EGFR de ninguna línea celular (Figura 22). Utilizando condiciones idénticas, MAb 806 no inmunoprecipitó el EGFR de las células U87MG parentales (datos no mostrados).

Localización in vivo de células A431 por MAb 806

Se realizó un segundo estudio de biodistribución con MAb 806 para determinar si podía localizar xenoinjertos de tumores A431. El estudio se llevó a cabo a lo largo de un período de tiempo más largo con el fin de obtener más información referente a la localización de xenoinjertos U87MG.Δ2-7 por MAb 806, que fueron incluidos en todos los ratones como control positivo. Además, se incluyó el anticuerpo anti-EGFR 528 como control positivo para los xenoinjertos A431, puesto que un estudio previo demostró una localización baja pero significativa por este anticuerpo de las células A431 desarrolladas en ratones carentes de sistema inmunitario.²¹ Durante las primeras 48 hr, MAb 806 presentó propiedades de localización casi idénticas a las observadas en los experimentos iniciales (Figura 7A en comparación con la Figura 4A). En términos de % DI/g de tumor, los niveles de MAb 806 en xenoinjertos U87MG.Δ2-7 disminuyeron lentamente después de 24 hr pero siempre permanecieron más altos que los niveles detectados en tejido

normal. La absorción en los xenoinjertos A431 fue comparativamente baja, sin embargo, hubo un pequeño incremento en % DI/g de tumor durante las primeras 24 hr no observado en tejidos normales tales como hígado, bazo, riñón y pulmón (Figura 7A). La absorción del anticuerpo 528 fue baja en ambos xenoinjertos cuando se expresó como % DI/g de tumor (Figura 7B). La autorradiografía de secciones de tejido con xenoinjerto A431 recogidas 24 hr después de la inyección con MAb 806 marcada con I¹²⁵ solo, ilustra claramente la localización por el anticuerpo de tumor viable cerca de la periferia del tumor y no de las zonas centrales de necrosis (Figura 23). En términos de razón de tumor con respecto a sangre MAb 806 mostró un máximo a las 72 hr para los xenoinjertos U87MG.Δ2-7 y a las 100 hr para los xenoinjertos A431 (Figura 8A, 8B). Aunque la razón de tumor:sangre para MAb 806 nunca sobrepasó 1,0 con respecto al tumor A431, aumentó todo el tiempo (Figura 8B) y fue mayor que en todos los otros tejidos examinados (datos no mostrados) indicando bajos niveles de localización. La razón de tumor con respecto a sangre para el anticuerpo 528 mostró un perfil similar para MAb 806 aunque se observaron niveles más altos en los xenoinjertos A431 (Figura 8A, 8B). MAb 806 tuvo una razón de tumor con respecto a hígado máxima en los xenoinjertos U87MG.Δ2-7 de 7,6 a las 72 hr, demostrando claramente una absorción preferente en estos tumores en comparación con el tejido normal (Figura 8C). Otras razones de tumor con respecto a órgano para MAb 806 fueron similares a las observadas en el hígado (datos no mostrados). La razón de tumor con respecto a hígado máxima para MAb 806 en xenoinjertos A431 fue de 2,0 a los 100 hr, indicando de nuevo una absorción ligeramente preferente en el tumor en comparación con el tejido normal (Figura 8D).

20 *Discusión*

El anticuerpo monoclonal L8A4 descrito previamente dirigido al péptido de empalme único encontrado en de2-7 EGFR, se comporta de una manera similar a MAb 806.³⁸ Utilizando células U87MG transfectadas con de2-7 EGFR, esta anticuerpo tuvo una tasa de internalización similar (35% a 1 hr en comparación con 30% a 1 hr para MAb 806) y presentó una localización *in vivo* comparable cuando se utilizaron fibroblastos 3T3 transfectados con de2-7 EGFR (máximo de 24% DI/g de tumor a las 24 hr en comparación con el 18% DI/g de tumor a las 8 hr para MAb 806).²⁵

Quizás la ventaja más importante de MAb 806 en comparación con los anticuerpos EGFR actuales, es que MAb 806 se puede conjugar directamente con agentes citotóxicos. Este enfoque no es factible con los anticuerpos específicos de EGFR actuales ya que estos se dirigen al hígado y la conjugación citotóxica induciría casi con certeza una grave toxicidad. La conjugación de los agentes citotóxicos tales como fármacos⁴¹ o radioisótopos⁴² con anticuerpos tiene el potencial de mejorar la eficacia y reducir la toxicidad generalizada de estos agentes. La capacidad de un anticuerpo conjugado para mediar la eliminación del tumor depende de su potencial para ser internalizado. De este modo, la rápida internalización observada con MAb 806 en células U87MG.Δ2-7, sugiere que MAb 806 es un candidato ideal para este tipo de enfoque.

MAb 806 es novedoso ya que es el primer anticuerpo específico para de2-7 EGFR dirigido a un epítipo no asociado con el péptido de empalme único. Tiene una afinidad superior y mejores propiedades de localización de tumores que DH8.3, un anticuerpo para de2-7 EGFR descrito previamente. Una propiedad importante, no obstante, es su capacidad para reconocer un subgrupo de moléculas expresadas sobre la superficie de células tumorales que manifiestan la amplificación del gen EGFR. Esto sugiere que MAb 806 puede poseer una propiedad clínica única; la capacidad para localizar el EGFR tanto de2-7 como amplificado pero no los receptores de tipo salvaje. Se ha demostrado que es correcto, este anticuerpo no se dirigirá a órganos tales como el hígado y por lo tanto sería más versátil que los anticuerpos actuales dirigidos al EGFR,^{18,19} que no pueden ser utilizados para el acoplamiento de agentes citotóxicos. Finalmente, MAb 806 puede ser un reactivo útil para analizar los cambios conformacionales inducidos por el truncamiento encontrado en el de2-7 EGFR.

Referencias

- 50 1. Wikstrand CJ, McLendon RE, Friedman AH, *et al.* Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII. *Cancer Res* 1997; 57:4130-40.
- 55 2. Olapade-Olaopa EO, Moscatello DK, MacKay EH, *et al.* Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. *Br J Cancer* 2000; 82:186-94.
3. Wikstrand CJ, Hale LP, Batra SK, *et al.* Monoclonal anticuerpos against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Cancer Res* 1995; 55:3140-8.
- 60 4. Garcia de Palazzo IE, Adams GP, Sundareshan P, *et al.* Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res* 1993; 53:3217-20.
- 65 5. Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, *et al.* Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:4309-13.
6. Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, *et al.* Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:2965-9.

ES 2 334 494 T3

7. **Yamazaki H, Ohba Y, Tamaoki N, et al.** A deletion mutation within the ligand binding domain is responsible for activation of epidermal growth factor receptor gene in human brain tumors. *Jpn J Cancer Res* 1990; 81:773-9.
8. **Yamazaki H, Fukui Y, Ueyama Y, et al.** Amplification of the structurally and functionally altered epidermal growth factor receptor gene (c-erbB) in human brain tumors. *Mol Cell Biol* 1988; 8:1816-20.
9. **Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, et al.** Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified re-arranged genes in human glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:8602-6.
10. **Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, et al.** A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:7727-31.
11. **Batra SK, Castelino-Prabhu S, Wikstrand CJ, et al.** Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene. *Cell Growth Differ* 1995; 6:1251-9.
12. **Nagane M, Coufal F, Lin H, et al.** A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res* 1996; 56:5079-86.
13. **Wikstrand CJ, Reist CJ, Archer GE, et al.** The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. *J Neurovirol* 1998; 4:148-58.
14. **Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, et al.** Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:4207-11.
15. **Okamoto S, Yoshikawa K, Obata Y, et al.** Monoclonal antibody against the fusion junction of a deletion-mutant epidermal growth factor receptor. *Br J Cancer* 1996; 73:1366-72.
16. **Hills D, Rowlinson-Busza G, Gullick WJ.** Specific targeting of a mutant, activated EGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody. *Int J Cancer* 1995; 63:537-43.
17. **Moscattello DK, Holgado-Madruga M, Godwin AK, et al.** Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res* 1995; 55:5536-9.
18. **Baselga J, Pfister D, Cooper MR, et al.** Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin. *J Clin Oncol* 2000; 18:904-14.
19. **Faillot T, Magdelenat H, Mady E, et al.** A phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas. *Neurosurgery* 1996; 39:478-83.
20. **Ponten J, Macintyre EH.** Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1968; 74:465-86.
21. **Masui H, Kawamoto T, Sato JD, et al.** Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res* 1984; 44:1002-7.
22. **Domagala T, Konstantopoulos N, Smyth F, et al.** Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between epidermal growth factor (EGF) and the extracellular domain of the EGF receptor. *Growth Factors* 2000; 18:11-29.
23. **Lindmo T, Boven E, Cuttitta F, et al.** Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J Immunol Methods* 1984; 72:77-89.
24. **Huang HS, Nagane M, Klingbeil CK, et al.** The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine fosforylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem* 1997; 272:2927-35.
25. **Reist CJ, Archer GE, Wikstrand CJ, et al.** Improved targeting of an anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody in tumor xenografts after labeling using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. *Cancer Res* 1997; 57:1510-5.
26. **Santon JB, Cronin MT, MacLeod CL, et al.** Effects of epidermal growth factor receptor concentration on tumorigenicity of A431 cells in nude mice. *Cancer Res* 1986; 46:4701-5.

27. **Kwok TT, Sutherland RM.** Differences in EGF related radiosensitisation of human squamous carcinoma cells with high and low numbers of EGF receptors. *Br J Cancer* 1991; 64:251-4.

28. **Filmus J, Pollak MN, Cailleau R, et al.** MDA-468, a human mama cancer cell line with a high number of epidermal growth factor (EGF) receptors, has an amplified EGF receptor gene and is growth inhibited by EGF. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 128:898-905.

29. **Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, et al.** Epidermal growth factor receptor (EGFR) y EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol* 1997; 8:1197-206.

30. **den Eynde B, Scott AM.** Tumor antigens. In: Delves PJ, Roitt IM, eds. Encyclopedia of immunology. London: Academic Press, 1998. 2424-31.

31. **Seymour L.** Novel anti-cancer agents in development: exciting prospects and new challenges. *Cancer Treat Rev* 1999; 25:301-12.

32. **Sturgis EM, Sacks PG, Masui H, et al.** Effects of anti-epidermal growth factor receptor antibody 528 on the proliferation and differentiation of head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994; 111:633-43.

33. **Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, et al.** Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* 1995; 1:1311-8.

34. **Fernandes H, Cohen S, Bishayee S.** Glycosylation-induced conformational modification positively regulates receptor-receptor association: a study with an aberrant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII/DEGFR) expressed in cancer cells. *J Biol Chem* 2001; 276:5375-83.

35. **Reist CJ, Garg PK, Alston KL, et al.** Radioiodination of internalizing monoclonal antibodies using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. *Cancer Res* 1996; 56:4970-7.

36. **Reist CJ, Archer GE, Kurpad SN, et al.** Tumor-specific anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibodies: use of the tyramine-cellobiose radio iodination method enhances cellular retention and uptake in tumor xenografts. *Cancer Res* 1995; 55:4375-82.

37. **Press OW, DeSantes K, Anderson SK, et al.** Inhibition of catabolism of radiolabeled antibodies by tumor cells using lysosomotropic amines and carboxylic ionophores. *Cancer Res* 1990; 50:1243-50.

38. **Reist CJ, Batra SK, Pegram CN, et al.** *In vitro* and *in vivo* behavior of radiolabeled chimeric anti-EGFRvIII monoclonal antibody: comparison with its murine parent. *Nucl Med Biol* 1997; 24:639 -47.

39. **Mineo C, Gill GN, Anderson RG.** Regulated migration of epidermal growth factor receptor from caveolae. *J Biol Chem* 1999; 274:30636-43.

40. **Luwor RB, Johns TG, Murone C, et al.** Monoclonal antibody 806 inhibits the growth of tumor xenografts expressing either the de2-7 or amplified epidermal growth factor receptor (EGFR) but not wild-type EGFR. *Cancer Res* 2001; 61:5355-61.

41. **Trail PA, Bianchi AB.** Monoclonal antibody drug conjugates in the treatment of cancer. *Curr Opin Immunol* 1999; 11:584-8.

42. **DeNardo SJ, Kmger LA, DeNardo GL.** A new era for radiolabeled antibodies in cancer? *Curr Opin Immunol* 1999; 11:563-9.

Ejemplo 19

Supresión del crecimiento de glioblastomas xenoinjertados intracraneales que expresan en exceso receptores del factor de crecimiento epidérmico mutante mediante la administración sistémica de anticuerpo monoclonal (mAb) 806, un anticuerpo monoclonal novedoso dirigido al receptor

Este ejemplo presenta la evaluación de mAb 806 sobre el crecimiento de gliomas xenoinjertados intracraneales en ratones carentes de sistema inmunitario. Lo siguiente corresponde a y fue presentado por Mishima *et al*, (2001) *Cancer Research*, 61:5349-5354. Los datos y descubrimientos de Mishima *et al*. se exponen más abajo.

El tratamiento generalizado con mAb 806 redujo significativamente el volumen de los tumores y aumentó la supervivencia de los ratones que portaban los xenoinjertos de gliomas U87 MG.ΔEGFR, LN-7,308.ΔEGFR, o A1207, cada uno de los cuales expresa elevados niveles de ΔEGFR. En contraste, el tratamiento con mAb 806 fue ineficaz con ratones que portaban los tumores U87 MG parentales, que expresaban niveles bajos de EGFR de tipo salvaje endógeno, o tumores U87 MG.DK, que expresaban niveles elevados de ΔEGFR carente de quinasa. Se produjo un ligero

incremento de supervivencia de los ratones xenoinjertados con glioma U87 MG que expresaba en exceso EGFR de tipo salvaje (U87 MG.wtEGFR) por medio del mAb 806 coincidente con su débil reactividad cruzada con tales células. El tratamiento de tumores U87 MG. Δ EGFR en ratones con mAb 806 ocasionó disminuciones tanto en el crecimiento del tumor como en la angiogénesis, así como un incremento de la apoptosis. Mecánicamente, el tratamiento con mAb 806 *in vivo* dio como resultado una reducción de la fosforilación del Δ EGFR activo constitutivamente y ocasionó una expresión regulada a la baja del protector apoptótico, Bcl-XL. Estos datos proporcionan una evidencia preclínica de que el tratamiento con mAb 806 puede ser un agente bioterapéutico útil para aquellos gliomas progresivos que expresan Δ EGFR.

El presente ejemplo demuestra que el tratamiento generalizado con el mAb específico de Δ EGFR novedoso, mAb 806, ocasiona una reducción de la fosforilación del Δ EGFR activo constitutivamente y de ese modo suprime el crecimiento de los gliomas implantados intracranalmente que expresan en exceso este receptor mutante en ratones carentes de sistema inmunitario y prolonga su supervivencia. La inhibición del crecimiento tumoral estaba mediada por un descenso en la proliferación y la angiogénesis y aumentó la apoptosis de las células tumorales. Esta supresión afectó a la señalización activa por Δ EGFR debido a que los xenoinjertos intracraneales que estaban derivados de células que expresaban en exceso el Δ EGFR carente de quinasa (DK), que son reconocidos igualmente bien por mAb 806, no fueron suprimidos significativamente después de la misma terapia.

Materiales y métodos

Líneas Celulares. Debido a que los explantes primarios de glioblastomas humanos pierden rápidamente la expresión los receptores reordenados, amplificados en cultivo, no existen líneas celulares de glioblastoma que muestren semejante expresión. Para forzar el mantenimiento de niveles de expresión comparables con los observados en tumores humanos, se infectaron células U87 MG, LN-Z308, y A1207 (donación del Dr. S. Aaronson, Mount Sinai Medical Center, New York, NY) con virus con Δ EGFR, Δ EGFR carente de quinasa (DK), o wtEGFR que también conferían resistencia a G418 como se ha descrito previamente (21). Las poblaciones que expresan niveles similares de los diferentes alelos de *EGFR* (estos niveles de expresión corresponden aproximadamente a un nivel de amplificación de 25 copias de genes; los glioblastomas humanos tienen típicamente niveles de amplificación de 10 a 50 copias de genes del receptor truncado) fueron seleccionadas mediante FACS como se ha descrito previamente (21) y se denominaron U87 MG. Δ EGFR, U87 MG.DK, U87 MG.wtEGFR, LN-Z308. Δ EGFR, LN-Z308.DK, LN-Z308.wtEGFR, A1207. Δ EGFR, A1207.DK, y A1207.wtEGFR, respectivamente. Cada una se mantuvo en medio que contenía G418 (líneas celulares U87 MG, 400 mg/ml; líneas celulares LN-Z308 y A1207, 800 mg/ml). mAbs. mAb 806 (IgG2b, k), un mAb específico de Δ EGFR, se produjo después de la inmunización de ratones con fibroblastos de ratón NR6 que expresaban Δ EGFR. Este se seleccionó de diferentes clones debido a que los análisis de hemaglutinación mostraron que tenía una reactividad elevada contra las células NR6. Δ EGFR, una reactividad baja para las NR6.wtEGFR, y ninguna para las células NR6.

Inmunoprecipitación y Análisis de Transferencia Western. Se lisaron las células con tampón de lisis que contenía HEPES 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, glicerol al 10%, Triton X-100 al 1%, EDTA 2 mM, SDS al 0,1%, desoxicolato de sodio al 0,5%, PP_i sódico 10 mM, Fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, Na₃ VO₄ 2 mM, leupeptina 5 μ g/ml, y aprotinina 5 μ g/ml. Los anticuerpos se incubaron con productos lisados celulares a 4°C durante 1 h antes de la adición de proteína-A y -G/Sefarosa. Los productos inmunoprecipitados se lavaron dos veces con tampón de lisis y una vez con tampón HNTG [HEPES 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, Triton X-100 al 0,1%, y glicerol 10%], se sometieron a electroforesis, y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las transferencias se sondearon con el anticuerpo anti-EGFR, C13, y las proteínas se visualizaron utilizando el sistema de detección quimioluminiscente ECL (Amersham Pharmacia Biotech). Los mAbs utilizados para la precipitación fueron mAb 806, clon de mAb anti-EGFR 528 (Oncogene Research Products, Boston, MA), o clon EGFR. 1 (Oncogene Research Products). Un mAb, C13, utilizado para la detección del tipo salvaje y de Δ EGFR en inmunotransferencias fue proporcionado por Dr. G. N. Gill (University of California, San Diego, CA). Se utilizaron anticuerpos para Bcl-X (anticuerpo policlonal de conejo; Transduction Laboratories, Lexington, KY) y fosfotirosina (4G10, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) para el análisis de transferencia Western como se ha descrito previamente (26).

Análisis de Citometría de Flujo. Las células se marcaron con el anticuerpo relevante seguido de IgG anti-ratón de cabra conjugada con fluoresceína (dilución 1:100; Becton-Dickinson PharMingen, San Diego, CA) como se ha descrito previamente (21). Las células teñidas se analizaron con un FACSCalibur utilizando el soporte lógico Cell Quest (Becton-Dickinson PharMingen). Para el primer anticuerpo, se utilizaron los siguientes mAb: mAb 806, mAb anti-EGFR clon 528, y clon EGFR.1. Se utilizó IgG2a o IgG2b de ratón como control del isotipo.

Terapia Tumoral. Se implantaron células U87 MG. Δ EGFR (1 X 10⁵) o 5 X 10⁵ células LN-Z308. Δ EGFR, A1207. Δ EGFR, U87 MG, U87 MG.DK, y U87 MG.wtEGFR en 5 μ l de PBS en el cuerpo estriado derecho en cerebros de ratones carentes de sistema inmunitario como se ha descrito previamente (27). La terapia generalizada con mAb 806, o control de isotipo IgG2b, se completó mediante inyección i.p. de 1 μ g de mAb en un volumen de 100 μ l en días alternos desde el día 0 después de la implantación al 14. Para la terapia directa de los tumores U87 MG. Δ EGFR intracerebrales, se inyectaron 10 μ g de mAb 806, o el control de isotipo IgG2b, en un volumen de 5 μ l en el sitio de la inyección del tumor en días alternos comenzando el día 1 durante 5 días.

Inmunohistoquímica. Para evaluar la angiogénesis en tumores, se fijaron en una solución que contenía cloruro de cinc, se embebieron en parafina, se hicieron secciones, y se inmunotñieron utilizando un anticuerpo monoclonal CD31

anti-ratón de rata (Becton-Dickinson PharMingen; 1:200). Se realizó la evaluación de la proliferación de las células tumorales mediante inmunohistoquímica Ki-67 sobre tejidos de tumor embebidos en parafina fijados con formalina. Después de la desparafinización y la rehidratación, se incubaron las secciones de tejido con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol para sofocar la peroxidasa endógena. Las secciones se bloquearon durante 30 min con suero de cabra y se incubaron durante la noche con el anticuerpo primario a 4°C. Las secciones se lavaron después con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado durante 30 min. Después de varios lavados con PBS, los productos se visualizaron utilizando estreptavidina-peroxidasa de rábano picante con diaminobenzidina como cromógeno y hematoxilina como contratinción. Como medida de la proliferación, se determinó el índice de marcaje Ki-67 como la razón de núcleos marcados:totales en campos de alta intensidad (3400). Se contaron aproximadamente 2.000 núcleos en cada caso mediante muestreo al azar sistemático. Para la tinción de macrófagos y células NK, se inmunotifieron secciones congeladas, fijadas con solución de paraformaldehído al 4% tamponada utilizando mAb F4/80 biotinilado (Serotec, Raleigh, NC) y anticuerpo policlonal antiasialo GM1 de conejo (Dako Chemicals, Richmond, VA), respectivamente. La angiogénesis se cuantificó como la zona con vasos utilizando un análisis computarizado. Para este fin, se inmunotifieron secciones utilizando anti-CD31 y se analizaron utilizando un sistema para el análisis de imágenes computarizado sin contratinción. Las MVA se determinaron capturando imágenes digitales de las secciones a un aumento de 3200 utilizando una cámara en color CCD como se ha descrito previamente (27). Después se analizaron las imágenes utilizando el soporte lógico Image Pro Plus versión 4.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) y se determinó la MVA midiendo la cantidad total de tinción en cada sección. Se evaluaron cuatro campos para cada porta. Este valor se representó como un porcentaje de la zona total en cada campo. Los resultados se confirmaron en cada experimento por al menos dos observadores (K. M., H-J. S. H.).

Análisis TUNEL. Se detectaron las células apoptóticas en tejido tumoral utilizando el método TUNEL como se ha descrito previamente (27). Se contaron las células positivas para TUNEL a X400. Se calculó el índice apoptótico como la razón del número de células apoptóticas:número total de células en cada campo.

Análisis Estadístico. Los datos se analizaron en cuanto a la significación mediante el test de la t de Student, excepto para los análisis de supervivencia *in vivo*, que se analizaron mediante el análisis de Wilcoxon.

Resultados

El Tratamiento Generalizado de mAb 806 Prolonga la Supervivencia de Ratones que Portan Tumores de Glioma Intracraneales que Expresan ΔEGFR en Exceso

Para someter a ensayo la eficacia del mAb anti-ΔEGFR, mAb 806, los autores de la presente invención trataron ratones carentes de sistema inmunitario que portaban xenoinjertos de glioma que expresaban en exceso ΔEGFR intracraneales con inyecciones i.p. de mAb 806, la IgG control de isotipo, o PBS. Se implantaron las células U87 MG.ΔEGFR intracranealmente en ratones carentes de sistema inmunitario, y los tratamientos comenzaron el mismo día como se describe en “Materiales y Métodos”.

Los animales tratados con PBS o IgG control de isotipo tuvieron una supervivencia media de 13 días, mientras los ratones tratados con mAb 806 tuvieron un incremento del 61,5% en la supervivencia media hasta los 21 días ($P < 0,001$; Figura 24A). El tratamiento de los ratones a los 3 días de la implantación, tras el establecimiento del tumor, también prolongó la supervivencia media de los animales tratados con mAb 806 en un 46,1% (de 13 días a 19 días; $P < 0,01$) en comparación con la de los grupos de control (datos no mostrados). Para determinar si estos efectos antitumorales de mAb 806 se extendían más allá de los xenoinjertos U87 MG.ΔEGFR, los autores de la presente invención también realizaron tratamientos similares en animales que portaban otros xenoinjertos de células de glioma de LN-Z308.ΔEGFR y A1207.ΔEGFR. La supervivencia media de los ratones tratados con mAb 806 que portaban xenoinjertos LN-Z308.ΔEGFR se prolongó de 19 días para los controles a 58 días ($P < 0,001$; Figura 24B). Notablemente, cuatro de los ocho animales tratados con mAb 806 sobrevivieron más de 60 días (Figura 24B). La supervivencia media de los animales que portaban xenoinjertos A1207.ΔEGFR también se prolongó de 24 días para los controles a 29 días ($P < 0,01$; datos no mostrados).

El Tratamiento con mAb 806 Inhibe el Crecimiento de Tumores de Cerebro que Expresan ΔEGFR en Exceso

Se sacrificaron ratones que portaban xenoinjertos U87 MG.ΔEGFR y LN-Z308. ΔEGFR el día 9 y el día 15, respectivamente. Se analizaron histopatológicamente secciones de los tumores, y se determinaron los volúmenes de los tumores como se describe en “Materiales y Métodos”. Coincidiendo con los resultados observados para la supervivencia de los animales, el tratamiento con mAb 806 redujo significativamente los volúmenes de U87 MG.ΔEGFR en un 90% ($P < 0,001$; Figura 24C), y de LN-Z308.ΔEGFR en un 95% ($P < 0,001$; Figura 24D), de los xenoinjertos en comparación con los de los grupos de control. Se obtuvieron resultados similares para animales que portaban tumores A1207.ΔEGFR (reducción del volumen del 65%; $P < 0,01$; datos no mostrados).

El Tratamiento Intratumoral con mAb 806 Prolonga la Supervivencia de Ratones que Portan Tumores de Cerebro U87 MG.ΔEGFR

Los autores de la presente invención también determinaron la eficacia de la inyección intratumoral directa de mAb 806 para el tratamiento de xenoinjertos U87 MG.ΔEGFR. Los animales recibieron inyecciones intratumorales de mAb 806 o IgG control de isotipo 1 día después de la implantación, como se describe en “Materiales y Métodos”. Los

animales de control sobrevivieron durante 15 días, mientras los ratones tratados con mAb 806 permanecieron vivos durante 18 días ($P < 0,01$; Figura 24E). Aunque el tratamiento intratumoral con mAb 806 fue algo eficaz, conllevaba las dificultades de múltiples inyecciones intracraneales y del riesgo de infección. Por lo tanto, los autores de la presente invención se centraron en los tratamientos generalizados para los estudios adicionales.

5

El Tratamiento con mAb 806 Prolonga Ligeramente la Supervivencia de Ratones que Portaban U87 MG.wtEGFR pero no de Ratones que Portaban U87 MG o U87 MG.DK Intracraneal Xenoinjertos

Para determinar si la inhibición del crecimiento por mAb 806 era selectiva para los tumores que expresan Δ EGFR, los autores de la presente invención trataron animales que portaban xenoinjertos de cerebro U87 MG, U87 MG.DK (Δ EGFR carente de quinasa) o U87 MG.wtEGFR. El tratamiento con mAb 806 no prolongó la supervivencia de los ratones con tumores U87 MG (Figura 25A), que expresaban un nivel bajo de wtEGFR endógeno (22), o de animales que portaban xenoinjertos U87 MG.DK, que expresaban en exceso un Δ EGFR carente de quinasa además de un nivel bajo de wtEGFR endógeno (Figura 25B). El tratamiento con mAb 806 prolongó ligeramente la supervivencia de ratones que portaban tumores U87 MG.wtEGFR ($P < 0,05$; supervivencia media, 23 días frente a 26 días para los grupos de control), que expresaban en exceso wtEGFR (Figura 25C).

15

La Reactividad de mAb 806 Se Corresponde con la Eficacia Antitumoral in Vivo

Para comprender el efecto diferencial de mAb 806 sobre los tumores que expresan diferentes niveles o diferentes tipos de EGFR, los autores de la presente invención determinaron la reactividad de mAb 806 con diferentes células tumorales mediante análisis FACS. Coincidiendo con los informes previos (21), el mAb 528 anti-EGFR reconocía tanto Δ EGFR como wtEGFR y demostraba una tinción más fuerte para células U87 MG. Δ EGFR en comparación con las células U87 MG (Figura 26A, 528). En contraste, el anticuerpo EGFR.1 reaccionaba con wtEGFR pero no con Δ EGFR (21), debido a que las células U87 MG. Δ EGFR son tan débilmente reactivas como las células U87 MG (Figura 26A, panel EGFR.1). Este anticuerpo EGFR.1 reaccionaba con U87 MG.wtEGFR más intensamente que con las células U87 MG, debido a que las células U87 MG.wtEGFR expresaban en exceso wtEGFR (Figura 26A, panel EGFR.1). Aunque mAb 806 reaccionaba intensamente con las células U87 MG. Δ EGFR y U87 MG.DK y no con las células U87 MG, reaccionaba débilmente con U87 MG.wtEGFR, lo que indicaba que mAb 806 es selectivo para Δ EGFR con una débil reactividad cruzada con el wtEGFR expresado en exceso (Figura 26A, panel mAb 806). Este nivel de reactividad con U87 MG.wtEGFR era cuantitativamente y cualitativamente similar a la prolongación de la supervivencia mediada por el tratamiento con el anticuerpo (Figura 25C). Los autores de la presente invención determinaron adicionalmente la especificidad de mAb 806 mediante inmunoprecipitación. Los EGFR de diferentes células se inmunoprecipitaron con anticuerpo 528, EGFR.1, y mAb 806. Las transferencias de las proteínas separadas electroforéticamente se sondearon después con el anticuerpo anti-EGFR, C13, que reconoce wtEGFR así como Δ EGFR y DK (22). Coincidiendo con el análisis FACS, el anticuerpo 528 reconocía wtEGFR y los receptores mutantes (Figura 26B-panel IP: 528), mientras el anticuerpo EGFR.1 reaccionaba con wtEGFR pero no con las especies mutantes (Figura 26B, panel IP: EGFR.1). Por otra parte, los niveles de receptores mutantes en las células U87 MG. Δ EGFR y U87 MG.DK son comparables con los de wtEGFR en las células U87 MG.wtEGFR (Figura 26B, panel IP: 528).

20

Sin embargo, el anticuerpo mAb 806 era capaz de precipitar solamente una pequeña cantidad del wtEGFR de los productos lisados de células U87 MG.wtEGFR en comparación con la gran cantidad de receptor mutante precipitado de las células U87 MG. Δ EGFR y U87 MG.DK, y una cantidad no detectable de las células U87 MG (Figura 26B, panel IP: mAb 806). Colectivamente, estos datos sugieren que mAb 806 reconoce un epítipo en Δ EGFR que también existe en una pequeña fracción wtEGFR solamente cuando es expresado en exceso sobre la superficie celular.

25

El Tratamiento con mAb 806 Reduce la Autofosforilación de AEGFR y Regula a la baja la Expresión de Bcl-XL en Tumores de Cerebro U87 MG. Δ EGFR

A continuación se investigaron los mecanismos subyacentes a la inhibición del crecimiento por mAb 806. Debido a que la actividad quinasa y la autofosforilación constitutivamente activas del extremo COOH de Δ EGFR son esenciales para sus funciones biológicas (21, 22, 28, 29), se determinó el estado de fosforilación de Δ EGFR en los tumores de animales tratados y de control. Como se muestra en la Figura 27A, el tratamiento con mAb 806 redujo espectacularmente la autofosforilación de Δ EGFR, aunque los niveles de receptor solo disminuyeron ligeramente en los xenoinjertos tratados con mAb 806. Los autores de la presente invención mostraron que la autofosforilación del receptor ocasiona la regulación al alza del gen antiapoptótico, *Bcl-X_L*, que juega un papel clave en la reducción de la apoptosis de los tumores que expresan en exceso Δ EGFR (28, 29). Por lo tanto, se determinó a continuación el efecto del tratamiento con mAb 806 sobre la expresión de *Bcl-X_L*. Los tumores con Δ EGFR de los animales tratados con mAb 806 mostraron en efecto niveles reducidos de *Bcl-XL* (Figura 27A).

30

El Tratamiento con mAb 806 Disminuye el Crecimiento y la Angiogénesis e Incrementa la Apoptosis en Tumores U87 MG.AEGFR

A la luz de la supresión *in vivo* causada por el tratamiento con mAb 806 y sus efectos bioquímicos sobre la señalización del receptor, los autores de la presente invención determinaron la tasa de proliferación de los tumores de los ratones de control o tratados. El índice proliferativo, medido mediante la tinción con Ki-67 de los tumores tratados con mAb 806, fue significativamente menor que el de los tumores de control ($P < 0,001$; Figura 28). Además, el análisis del índice apoptótico por medio de la tinción TUNEL demostró un incremento significativo en el número

35

de células apoptóticas en los tumores tratados con mAb 806 en comparación con los tumores de control ($P < 0,001$; Figura 28). También se analizó el grado de vascularización del tumor mediante inmunotinción de los tumores de los especímenes tratados y de control para CD31. Para cuantificar la vascularización del tumor, se midieron las MVA utilizando el análisis de imágenes computarizado. Los tumores tratados con mAb 806 mostraron un 30% menos de MVA que los tumores de control ($P < 0,001$; Figura 28). Para comprender si la interacción entre receptor y anticuerpo puede provocar una respuesta inflamatoria, los autores de la presente invención tiñeron secciones de tumor para el marcador de macrófagos, F4/80, y el marcador de células NK, asialo GM1. Los macrófagos fueron identificados en toda la matriz tumoral y se acumulaban especialmente en la periferia del tumor U87 MG tratado con mAb 806 (Figura 28). Los autores de la presente invención observaron algunas células NK infiltradas en y alrededor de los tumores y ninguna diferencia significativa entre los tumores tratados con mAb 806 y los de control de isotipo (datos no mostrados).

Discusión

Δ EGFR parece ser una diana terapéutica potencial atractiva para el tratamiento canceroso de los gliomas. Esto está correlacionado con una mala prognosis (25), mientras su inhibición genética o farmacológica suprime eficazmente el crecimiento de las células que expresan Δ EGFR en exceso tanto *in vitro* como *in vivo* (29, 30). Debido a que este EGFR mutante es expresado sobre la superficie de la célula, representa una diana potencial para la terapia basada en anticuerpos, y, aquí, los autores de la presente invención sometieron a ensayo la eficacia de un mAb anti- Δ EGFR novedoso, mAb 806, en el tratamiento de los xenoinjertos intracraneales de los gliomas que expresan Δ EGFR en exceso de diferentes antecedentes celulares en ratones carentes de sistema inmunitario. La administración generalizada de mAb 806 inhibía el crecimiento tumoral y prolongaba la supervivencia del animal. El efecto del mAb 806 era evidente para cada una de las líneas celulares y era independiente del estado p53 de los tumores, debido a que U87 MG, Δ EGFR y A1207, Δ EGFR expresaban p53 de tipo salvaje, mientras LN-Z308, Δ EGFR era nula para p53.

El aumento de tumorigenicidad de Δ EGFR está mediado por su actividad quinasa y de autofosforilación de tirosina activa constitutivamente en el extremo COOH (22, 28, 29). La fosforilación de Δ EGFR en tumores tratados con mAb 806 disminuía significativamente, reducía su proliferación, y elevaba la apoptosis, lo que sugiere que el efecto antitumoral de mAb 806 es, al menos en parte, atribuible a la inhibición de la función intrínseca del receptor. La señalización de Δ EGFR causada por la regulación al alza del gen apoptótico, *Bcl-X L* (28), y el tratamiento con mAb 806 dieron como resultado la regulación a la baja de la expresión de *Bcl-X L*, que sugiere adicionalmente que el efecto antitumoral de mAb 806 está mediado por la inhibición de la señalización de Δ EGFR. El nivel de Δ EGFR en los tumores tratados con mAb 806 también se redujo ligeramente (Figura 27A), pero no hasta el punto de que concordara con el grado de desfosforilación del receptor mutante o suficiente para explicar la magnitud de su efecto biológico. Es probable que el efecto antitumoral de mAb 806 resulte, al menos en parte, de la inhibición de la función de señalización intrínseca de Δ EGFR. Esta afirmación también está apoyada por la carencia de efectos antitumorales sobre los tumores DK, que se unen al anticuerpo pero son carentes de quinasa.

La inyección intratumoral de un anticuerpo anti- Δ EGFR diferente, mAbY10, inhibió el crecimiento de tumores de melanoma B16 que expresaban Δ EGFR en cerebros de ratón por medio de un mecanismo dependiente de Fc/receptor de Fc (31). Junto con esto, se demostró que mAbY10 media la citotoxicidad de macrófagos dependiente de anticuerpos *in vitro* con células efectoras tanto murinas como humanas (17), aunque tenía un efecto pequeño con la infiltración de macrófagos encontrada en los tumores tratados con mAb 806 de los autores de la presente invención, queda la cuestión de si el efecto anti-tumoral de mAb 806 se puede conseguir por la citotoxicidad mediada por macrófagos. Los autores de la presente invención creen que esto es poco probable, puesto que la infiltración de macrófagos también se producía en el tratamiento con mAb 806 de tumores U87 MG.DK (Δ EGFR carente de quinasa), en los que resultaba ineficaz en la regulación del crecimiento del tumor.

mAb 806 parece ser selectivo para Δ EGFR con una débil reactividad cruzada con el wtEGFR expresado en exceso. En concordancia con la especificidad *in vitro*, el tratamiento con mAb 806 fue muy eficaz en tumores que expresaban Δ EGFR en exceso, mientras mostraba una inhibición del crecimiento mucho menos robusta, pero reproducible para tumores que expresaban wtEGFR en exceso. No obstante, la simple interacción entre mAb 806 y sus moléculas diana es insuficiente para inhibir el crecimiento tumoral porque, aunque mAb 806 es capaz de unirse igualmente bien a receptores Δ EGFR carentes de quinasa (DK) y a Δ EGFR, es ineficaz para afectar al crecimiento de tumores que expresan DK. La incapacidad de mAb 806 para interactuar con bajo nivel de wtEGFR normalmente presente en las células sugiere una gran ventana terapéutica para los cánceres con Δ EGFR expresado en exceso así como, en un grado menor, los cánceres con wtEGFR expresado en exceso cuando se comparaban con los tejidos normales.

Aunque el tratamiento con mAb 806 fue eficaz para la supresión de xenoinjertos intracraneales, se debe observar que los tumores con Δ EGFR crecían eventualmente, y no se lograban remisiones duraderas. Esto puede ser el resultado de una distribución ineficaz del anticuerpo en la masa tumoral. Los mAb combinados con otras modalidades terapéuticas tales como toxinas, isótopos o fármacos, para los tratamientos contra el cáncer han demostrado ser más eficaces que el anticuerpo solo en muchos casos (2, 3, 32-34). Los fármacos quimioterapéuticos tales como la doxorubicina y el cisplatino junto con los anticuerpos para wtEGFR también han demostrado una actividad antitumoral intensificada (35, 36). Los tratamientos combinados dirigidos al crecimiento del tumor así como al desarrollo angiogénico han inhibido más eficazmente el crecimiento del glioblastoma que cualquier tratamiento solo (27). Esto eleva la posibilidad de que mAb 806 combinado con fármacos quimioterapéuticos o compuestos que modulan la angiogénesis puedan ser incluso más eficaces que mAb 806 solo.

Referencias

1. **Old**, L. J. Immunotherapy for cancer. *Sci. Am.*, 275: 102-109, 1996.
- 5 2. **Weiner**, L. M. An overview of monoclonal antibody therapy of cancer. *Semin. Oncol.*, 26 (Suppl. 12): 41-50, 1999.
3. **Green**, M. C., **Murray**, J. L., y **Hortobagyi**, G. N. Monoclonal antibody therapy for solid tumors. *Cancer Treat. Rev.*, 26: 269-286, 2000.
- 10 4. **Ashley**, D. M., **Batra**, S. K., y **Bigner**, D. D. Monoclonal antibodies to growth factors and growth factor receptors: their diagnostic and therapeutic potential in brain tumors. *J. Neurooncol.*, 35: 259-273, 1997.
- 15 5. **Fan**, Z., y **Mendelsohn**, J. Therapeutic application of anti-growth factor receptor antibodies. *Curr. Opin. Oncol.*, 10: 67-73, 1998.
- 20 6. **Slamon**, D. J., **Godolphin**, W., **Jones**, L. A., **Holt**, J. A., **Wong**, S. G., **Keith**, D. E., **Levin**, W. J., **Stuart**, S. G., **Udove**, J., **Ullrich**, A., y **Press**, M. F. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* (Wash. DC), 244: 707-712, 1989.
7. **Harari**, D., y **Yarden**, Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action en breast cancer. *Oncogene*, 19: 6102-6114, 2000.
- 25 8. **Sliwkowski**, M. X., **Lofgren**, J. A., **Lewis**, G. D., **Hotaling**, T. E., **Fendly**, B. M., y **Fox**, J. A. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin. Oncol.*, 26 (Suppl. 12): 60-70, 1999.
- 30 9. **Baselga**, J., **Tripathy**, D., **Mendelsohn**, J., **Baughman**, S., **Benz**, C. C., **Dantis**, L., **Sklar**, N. T., **Seidman**, A. D., **Hudis**, C. A., **Moore**, J., **Rosen**, P. P., **Twaddell**, T., **Henderson**, I. C., y **Norton**, L. Phase II study of semantaly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overex-pressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 14: 737-744, 1996.
10. **Baselga**, J. Clinical trials of Herceptin(R) (trastuzumab). *Eur. J. Cancer*, 37: 18-24, 2001.
- 35 11. **Salomon**, D. S., **Brandt**, R., **Ciardello**, F., y **Normanno**, N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 19: 183-232, 1995.
12. **Mendelsohn**, J. Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as anticancer therapy. *Clin. Cancer Res.*, 3: 2703-2707, 1997.
- 40 13. **Waksal**, H. W. Role of an anti-epidermal growth factor receptor in treating cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, 18: 427-436, 1999.
14. **Faillot**, T., **Magdelenat**, H., **Mady**, E., **Stasiecki**, P., **Fohanno**, D., **Gropp**, P., **Poisson**, M., y **Delattre**, J. Y. A Phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas. *Neurosurgery* (Baltimore), 39: 478-483, 1996.
- 45 15. **Wikstrand**, C. J., **Reist**, C. J., **Archer**, G. E., **Zalutsky**, M. R., y **Bigner**, D. D. The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. *J. Neurovirol.*, 4: 148-158, 1998.
- 50 16. **Wong**, A. J., **Ruppert**, J. M., **Bigner**, S. H., **Grzeschik**, C. H., **Humphrey**, P. A., **Bigner**, D. S., y **Vogelstein**, B. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 2965-2969, 1992.
- 55 17. **Wikstrand**, C. J., **Cokgor**, I., **Sampson**, J. H., y **Bigner**, D. D. Monoclonal antibody therapy of human gliomas: current status and future approaches. *Cancer Metastasis Rev.*, 18: 451-464, 1999.
18. **Garcia de Palazzo**, I. E., **Adams**, G. P., **Sundareshan**, P., **Wong**, A. J., **Testa**, J. R., **Bigner**, D. D., y **Weiner**, L. M. Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res.*, 53: 3217-3220, 1993.
- 60 19. **Moscato**, D. K., **Holgado-Madruga**, M., **Godwin**, A. K., **Ramirez**, G., **Gunn**, G., **Zoltick**, P. W., **Biegel**, J. A., **Hayes**, R. L., y **Wong**, A. J. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res.*, 55: 5536-5539, 1995.
- 65 20. **Olapade-Olaopa**, E. O., **Moscato**, D. K., **MacKay**, E. H., **Horsburgh**, T., **Sandhu**, D. P., **Terry**, T. R., **Wong**, A. J., y **Habib**, F. K. Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. *Br. J. Cancer*, 82: 186-194, 2000.

21. Nishikawa, R., Ji, X. D., Harmon, R. C., Lazar, C. S., Gill, G. N., Cavenee, W. K., y Huang, H. J. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 7727-7731, 1994.
- 5 22. Huang, H-J. S., Nagane, M., Klingbeil, C. K., Lin, H., Nishikawa, R., Ji, X. D., Huang, C. M., Gill, G. N., Wiley, H. S., y Cavenee, W. K. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine fosforylation and unattenuated signaling. *J. Biol. Chem.*, 272: 2927-2935, 1997.
- 10 23. Mishima, K. Nagane, M., Lin, H., Cavenee, W. K., y Huang, H-J. S. Expression of a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor mediates glioma cell invasion *in vivo*. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 40: 519, 1999.
24. Han, Y., Cadía, C. G., Nanda, A., Cavenee, W. K., y Huang, H. J. Tyrphostin AG1478 preferentially inhibits human glioma cells expressing truncated rather than wild-type epidermal growth factor receptors. *Cancer Res.*, 56: 3859-3861, 1996.
25. Feldkamp, M. M., Lala, P., Lau, N., Roncari, L., y Guha, A. Expression of activated epidermal growth factor receptors, Ras-guanosine triphosphate, and mitogen-activated protein kinase in human glioblastoma multiforme specimens. *Neurosurgery* (Baltimore), 45: 1442-1453, 1999.
- 20 26. Nagane, M., Levitzki, A., Gazit, A., Cavenee, W. K., y Huang, H-J. S. Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 5724-5729, 1998.
- 25 27. Mishima, K., Mazar, A. P., Gown, A., Skelly, M., Ji, X. D., Wang, X. D., Jones, T. R., Cavenee, W. K., y Huang, H-J. S. A peptide derived from the non-receptor-binding region of urokinase plasminogen activator inhibits glioblastoma growth and angiogenesis *in vivo* in combination with cisplatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 8484-8489, 2000.
- 30 28. Nagane, M., Coufal, F., Lin, H., Bogler, O., Cavenee, W. K., y Huang, H-J. S. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation y reducing apoptosis. *Cancer Res.*, 56: 5079-5086, 1996.
- 35 29. Nagane, M., Lin, H., Cavenee, W. K., y Huang, H-J. S. Aberrant receptor signaling in human malignant gliomas: mechanisms and therapeutic implications. *Cancer Lett.*, 162 (Suppl. 1): S17-S21, 2001.
- 30 30. Halatsch, M. E., Schnridt, U., Botefur, L. C., Holland, J. F., y Ohnuma, T. Marked inhibition of glioblastoma target cell tumorigenicity *in vitro* by retrovirus-mediated transfer of a hairpin ribozyme against deletion-mutant epidermal growth factor receptor messenger RNA. *J. Neurosurg.*, 92: 297-305, 2000.
- 40 31. Sampson, J. H. Crotty, L. E., Lee, S., Archer, Q. E., Ashley, D. M., Wikstrand, C. J., Rale, L. P., Small, C., Dranoff, G., Friedman, A. H., Friedman, H. S., y Bigner, D. D. Unarmed, tumor-specific monoclonal antibody effectively treats brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 7503-7508, 2000.
- 45 32. Trail, P. A, y Bianchi, A. B. Monoclonal antibody drug conjugates in the treatment of cancer. *Curr. Opin. Immunol.*, 11: 584-588, 1999.
- 50 33. Pietras, R. J., Pegram, M. D., Finn, R. S., Maneval, D. A., y Slamon, D. J. Remission of human mama cancer xenografts on therapy with humanized monoclonal antibody to HER-2 receptor and DNA-reactive drugs. *Oncogene*, 17: 2235-2249, 1998.
- 55 34. Baselga, J., Norton, L., Albanell, J., Kim, Y. M., y Mendekohn, J. Recombinant humanized and-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res.*, 58: 2825-2831, 1998.
35. Baselga, J., Norton, L., Masui, H., Pandiella, A., Coplan, K., Miller, W. H., y Mendelsohn, J. Antitumor effects of doxombicin in combination with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *J. Natl. Cancer Inst.* (Bethesda), 85: 1327-1333, 1993.
- 60 36. Fan, Baselga, J., Masui, HL, y Mendelsohn, J. Antitumor effect of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies plus cis-diamminedichloroplatinum on well established A431 cell xenografts. *Cancer Res.*, 53: 4637-4642, 1993.

Ejemplo 20

El anticuerpo monoclonal 806 inhibe el crecimiento de xenoinjertos de tumor que expresan el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) de2-7 o amplificado pero no el EGFR de tipo salvaje

5 El siguiente ejemplo presenta descubrimientos de los autores de la presente invención que también son expuestos por Luwor *et al.*, (2001) Cancer Research, 61:5355-5361.

10 El anticuerpo monoclonal (mAb) 806 se originó contra el factor de crecimiento epidérmico delta2-7 (de2-7 EGFR o EGFRvIII), una versión truncada del EGFR expresado comúnmente en glioma. Inesperadamente, el mAb 806 también se unía al EGFR expresado por las células que mostraban la amplificación del gen *EGFR* pero no por las células o el tejido normal que expresaban el receptor de tipo salvaje en ausencia de amplificación del gen. La especificidad única de mAb 806 ofrece una ventaja sobre los anticuerpos para EGFR actuales, que presentan una unión significativa al hígado y la piel en seres humanos. Por lo tanto, los autores de la presente invención examinaron la actividad antitumoral de mAb 806 frente a xenoinjertos de tumores humanos desarrollados en ratones carentes de sistema inmunitario. El crecimiento de xenoinjertos U87 MG, una línea celular de glioma que expresa endógenamente $\sim 10^5$ EGFR en ausencia de amplificación del gen, no era inhibido por mAb 806. En contraste, mAb 806 inhibía significativamente el crecimiento de xenoinjertos U87 MG transfectados con el de2-7 EGFR de una manera dependiente de la dosis utilizando modelos de tumor tanto preventivos como establecidos. Significativamente, las células U87 MG transfectadas con el EGFR de tipo salvaje, que incrementa la expresión a $\sim 10^6$ EGFR/célula e imita la situación de la amplificación del gen, también eran inhibidas por mAb 806 cuando se desarrollaban como xenoinjertos en ratones carentes de sistema inmunitario. Los xenoinjertos tratados con mAb 806 presentaban todas las zonas de necrosis que estaban ausentes en los tumores de control. Esta reducción de la viabilidad del xenoinjerto no estaba mediada por la regulación a la baja del receptor o la selección clonal ya que los niveles de expresión antigénica eran similares en los grupos de control y en los tratados. El efecto antitumoral de mAb 806 no estaba restringido a las células U87 MG porque el anticuerpo inhibía el crecimiento de los xenoinjertos A431 nuevos y establecidos, una línea celular que expresa $>10^6$ EGFR/célula. Este estudio demuestra que mAb 806 posee una actividad antitumoral significativa.

30 El mAb 806 específico de de2-7 EGFR fue producido después de la inmunización de ratones con fibroblastos de ratón NR6 que expresaban el de2-7 EGFR truncado. El mAb 806 se une a la línea celular de glioma U87 MG transfectada con de2-7 EGFR pero no a la línea celular U87 MG parental, que expresa el wt EGFR sin amplificación del gen.³ Se observaron resultados similares *in vivo* con un mAb 806 que mostraba una localización específica de xenoinjertos U87 MG que expresaban de2-7 EGFR pero no de tumores U87 MG parentales.³ De manera interesante, mAb 806 era capaz de unirse a un subgrupo de EGFR ($\sim 10\%$) sobre la superficie de la línea celular A431, que contiene un gen *EGFR* amplificado. Por lo tanto, a diferencia de todos los demás anticuerpos específicos de de2-7 EGFR, que reconocen el péptido de empalme único que es generado por el truncamiento de2-7 EGFR, mAb 806 se une a un epítipo también encontrado en el wt EGFR expresado en exceso. No obstante, parecería que este epítipo es expuesto preferentemente en el de2-7 EGFR y una pequeña proporción de receptores expresados en células que contienen la amplificación del gen wt *EGFR*. Importantly, los tejidos normales que expresan niveles elevados de wt EGFR endógeno, tales como el hígado y la piel, no muestran una unión significativa a mAb 806. Basándose en la propiedad única del mAb 806 para unirse al EGFR tanto de2-7 como wt amplificado pero no al wt EGFR nativo cuando se expresa a niveles normales, los autores de la presente invención decidieron examinar la eficacia de mAb 806 contra numerosas líneas celulares de tumor desarrolladas como xenoinjertos en ratones carentes de sistema inmunitario.

45 *Materiales y métodos*

Líneas Celulares y Anticuerpos Monoclonales. La línea celular de glioblastoma humano U87 MG, que expresa endógenamente el wt EGFR, y las líneas celulares transfectadas U87 MG. Δ 2-7 y U87 MG.wtEGFR, que expresan de2-7 EGFR y expresan en exceso wt EGFR, respectivamente, han sido descritas previamente (16, 23). La línea celular de carcinoma epidermoide A431 ha sido descrita previamente (24).

Todas las líneas celulares se mantuvieron en DMEM (DMEM/F12; Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) que contenía FCS al 10% (CSL, Melbourne, Victoria, Australia), glutamina 2 mM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), y penicilina/estreptomina (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY). Además, se mantuvieron las líneas celulares U87 MG.D2-7 y U87 MG.wtEGFR en 400 mg/ml de geneticina (Life Technologies, Inc., Melbourne, Victoria, Australia). Las líneas celulares se desarrollaron a 37°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%. El mAb 806 (IgG2b) fue producido después de la inmunización de los ratones con fibroblastos de ratón NR6 que expresaban de2-7 EGFR. El mAb 806 se seleccionó después de que los análisis Rosette mostraran la unión a células NR6, que expresaban en exceso el de2-7 EGFR (título de 1:2500). El mAb 528, que reconoce el EGFR tanto de2-7 como wt, ha sido descrito previamente (10) y fue producido en Biological Production Facility (Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne, Victoria, Australia) utilizando un hibridoma obtenido de la Colección de Cultivos Tipo Americana (Rockville, MD). El DH8.3 mAb, que es específico para el de2-7 EGFR, fue amablemente proporcionado por el Prof. William Gullick (University of Kent and Canterbury, Kent, United Kingdom) (19). El anticuerpo policlonal sc-03 dirigido al dominio COOH-terminal del EGFR fue adquirido de Santa Cruz Bio-technology (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

Análisis FACS de la Expresión del Receptor. Las líneas celulares U87 MG parentales y transfectadas cultivadas fueron analizadas en cuanto a la expresión de EGFR wt y de2-7 utilizando los anticuerpos 528, 806, y DH8.3. Las

células (1 3 10 6) se incubaron con 5 mg/ml del anticuerpo apropiado o un control negativo del mismo isotipo en PBS que contenía HSA al 1% durante 30 min a 4°C. Después de estos tres lavados con PBS/HSA al 1%, las células se incubaron 30 minutos más a 4°C con anticuerpo anti-ratón de cabra acoplado a FITC (dilución 1:100; Calbiochem, San Diego, CA). Después de tres lavados consecutivos, las células se analizaron en un Epics Elite ESP (Beckman Coulter, Hialeah, FL) observando un mínimo de 20.000 eventos y se analizaron utilizando EXPO (versión 2) para Windows.

Análisis Scatchard. El mAb 806 se marcó con I¹²⁵ (Amrad, Mel-bourne, Victoria, Australia) mediante el método de la Cloramina T. Todos los análisis de unión se realizaron en HSA/PBS al 1% sobre 1-2 X 10⁶ células U87 MG.Δ2-7 o A431 vivas durante 90 min a 4°C con rotación suave. Se utilizó una concentración ajustada de 10 ng/ml de mAb 806 marcado con I¹²⁵ en presencia de concentraciones crecientes de anticuerpo no marcado. Se determinó la unión no específica en presencia de un exceso de 10.000 de anticuerpo no marcado. Tras la incubación, las células se lavaron y se contó el mAb 806 marcado con I¹²⁵ unido utilizando un contador gamma COBRA II (Packard Instrument Company, Meriden, CT). El análisis Scatchard se realizó tras la corrección para la inmunorreactividad.

Estudios de Inmunoprecipitación Studies. Las células se marcaron durante 16 horas con 100 mCi/ml de Tran 35 S-Label (ICN Biomedicals, Irvine, CA) en DMEM sin metionina/cisteína con un suplemento de FCS sometido a diálisis al 5%. Después de lavar con PBS, las células se colocaron en tampón de lisis (Triton X-100 al 1%, HEPES 30 mM, NaCl 150 mM, fluoruro de 4-(2-aminoetil)benzeno-sulfonilo 500 mM, aprotinina 150 nM, inhibidor de proteasa E-64 1 mM, EDTA 0,5 mM, y leupeptina 1 mM, pH 7,4) durante 1 h a 4°C. Los productos lisados se aclararon mediante centrifugación durante 10 min a 12, 000 3 g y después se incubaron con 5 mg de anticuerpo apropiado durante 30 min a 4°C antes de la adición de proteína A-Sefarosa. Los productos inmunoprecipitados se lavaron tres veces con tampón de lisis, se mezclaron con tampón de muestra SDS, se separaron mediante electroforesis en gel utilizando un gel al 7,5% que después se secó, y se expuso a una película de rayos X.

Modelos de Xenoinjerto. En concordancia con informes previos (23, 25), las células U87 MG transfectadas con de2-7 EGFR crecieron más rápidamente después las células parentales y las células U87 MG transfectadas con wt EGFR. Se inocularon células tumorales (3 X 10⁶) en 100 ml de PBS s.c. en ambos flancos de ratones hembra carentes de sistema inmunitario de 4-6 semanas de edad (Animal Research Center, Western Australia, Perth, Australia). Se investigó la eficacia terapéutica de mAb 806 en modelos de tumor tanto preventivos como establecidos. En el modelo preventivo, se trataron cinco ratones con dos xenoinjertos cada uno i.p. con 0,1 o 1 mg de mAb 806 o vehículo (PBS) empezando el día antes de la inoculación de las células tumorales. El tratamiento continuó durante un total de seis dosis, tres veces por semana durante 2 semanas. En el modelo establecido, el tratamiento se inició cuando los tumores habían alcanzado un volumen medio de 65 mm³ (U87 MG.Δ2-7), 84 mm³ (U87 MG), 73 mm³ (U87 MG.wtEGFR), o 201 mm³ (tumores A431). El volumen medio del tumor en mm³ se determinó utilizando la fórmula (longitud³ anchura²)/2, donde la longitud era el eje más largo y la anchura la medida en los ángulos rectos con respecto a la longitud (26). Los datos se expresaron como el volumen medio del tumor ± DT para cada grupo de tratamiento. Este proyecto de investigación fue aprobado por el Animal Ethics Committee del Austin and Repatriación Medical Centre.

Examen Histológico de Xenoinjertos de Tumor. Se extirparon los xenoinjertos en los momentos indicados y se diseccionaron. Una mitad se fijó con formalina/PBS al 10% antes de ser embebida en parafina. Después se cortaron secciones de 4 mm y se tiñeron con H&E para su examen histológico rutinario. La otra mitad se embebió en compuesto Tissue Tek OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA), se congeló en nitrógeno líquido, y se almacenó a 280°C. Se cortaron secciones finas (5 mm) con un criostato y se fijaron en acetona enfriada con hielo durante 10 min, seguido de secado al aire durante 10 min más. Las secciones se bloquearon en reactivo de bloqueo de proteína (Lipshaw Immunon, Pittsburgh, PA) durante 10 min y después se incubaron con anticuerpo primario biotinilado (1 mg/ml) durante 30 min a la temperatura ambiente. Todos los anticuerpos se biotinilaron utilizando el módulo de biotinilación de proteína ECL (Amersham, Baulkham Hills, NSW, Australia), siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de enjuagar con PBS, las secciones se incubaron con un complejo de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante durante 30 min más (Silenus, Melbourne, Victoria, Australia). Tras un lavado final con PBS, las secciones se expusieron a sustrato de 3-amino-9-etilcarbazol [ácido acético 0,1 M, acetato de sodio 0,1 M, 3-amino-9-etilcarbazol 0,02 M (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)] en presencia de peróxido de hidrógeno durante 30 min. Las secciones se enjuagaron con agua y se contratiñeron con hematoxilina durante 5 min y se montaron.

Análisis Estadístico. Las medidas de los tumores *in vivo* en mm³ se expresan como la media ± DT. Las diferencias entre los grupos de tratamiento en momentos puntuales dados se sometieron a ensayo para la significación estadística utilizando el test de la t de Student.

Resultados

Unión de Anticuerpos a Líneas Celulares. Para determinar la especificidad de mAb 806, se analizó su unión a células U87 MG, U87 MG.D2-7, y U87 MG.wtEGFR mediante FACS. Se incluyó una IgG2b irrelevante (mAb 100-310 dirigida al antígeno A33) humano como control de isotipo para mAb 806, y se incluyó el anticuerpo 528 porque reconoce el EGFR tanto de2-7 como. Solamente el anticuerpo 528 fue capaz de teñir la línea celular U87 MG parental (Figura 29), en concordancia con informes previos demostrando que estas células expresan el wt EGFR (16). El mAb 806 tenía niveles de unión similares a los del anticuerpo de control, demostrando claramente que no es capaz de unirse al wt EGFR (Figura 29). La unión del anticuerpo de control de isotipo a las líneas celulares U87 MG.D2-7 y U87 MG.wtEGFR fue similar a la observada para las células U87 MG. El mAb 806 tiñó las células U87 MG.D2-7 y U87 MG. wtEGFR, indicando que el mAb 806 reconocía específicamente el de2-7 EGFR y un subgrupo de EGFR

expresado en exceso (Figura 29). Como se esperaba, el anticuerpo 528 tiñó las líneas celulares U87 MG.Δ2-7 y U87 MG.wtEGFR (Figura 29). La intensidad de tinción del anticuerpo 528 sobre las células U87 MG.wtEGFR fue mucho mayor que la de mAb 806, sugiriendo que mAb 806 solamente reconoce una porción del EGFR expresado en exceso. La reactividad de mAb 806 observada con las células U87 MG.wtEGFR es similar a la obtenida con las células A431, otra línea celular que expresa el wt EGFR en exceso.³

Se realizó un análisis Scatchard utilizando células U87 MG.Δ2-7 y A431 para determinar la afinidad relativa y los sitios de unión para mAb 806 en cada línea celular. mAb 806 tenía una afinidad por el receptor de de2-7 EGFR de $1,1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ y reconocía una media (tres experimentos por separado) de $2,4 \times 10^5$ sitios de unión/célula. En contraste, la afinidad de mAb 806 por wt EGFR sobre las células A431 era solamente de $9,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. De manera interesante, mAb 806 reconocía $2,3 \times 10^5$ sitios de unión sobre la superficie de A431, que es alrededor de 10 veces inferior que el número referido de EGFR encontrados en estas células. Para confirmar el número de EGFR sobre la superficie de las células A431 de los autores de la presente invención, los autores de la presente invención realizaron un análisis Scatchard utilizando anticuerpo 528 marcado con I¹²⁵. Como se esperaba, este anticuerpo se unía a aproximadamente 2×10^6 sitios sobre la superficie de las células A431. De este modo, parece que mAb 806 solamente se une a una porción de los receptores EGFR sobre la superficie de las células A431. En gran medida, el mAb 806 marcado con I¹²⁵ no se unía a las células U87 MG parentales en absoluto, ni siquiera cuando el número de células se incrementaba a 1×10^7 .

Inmunoprecipitaciones. Los autores de la presente invención caracterizaron la reactividad de mAb 806 en diferentes líneas celulares mediante inmunoprecipitación después del marcaje con S³⁵ utilizando mAb 806, sc-03 (un anticuerpo policlonal comercial específico para el dominio COOH-terminal del EGFR) y un control de isotipo IgG2b. El anticuerpo sc-03 inmunoprecipitó tres bandas de células U87 MG.Δ2-7, un doblete correspondiente a las dos bandas de de2-7 EGFR observadas en estas células y una banda de peso molecular superior correspondiente a wt EGFR (Figura 30). En contraste, aunque mAb 806 inmunoprecipitaba las dos bandas de de2-7 EGFR, el wt EGFR estaba completamente ausente (Figura 30). El patrón observado en las células U87 MG.wtEGFR y A431 era esencialmente idéntico. El anticuerpo sc-03 inmunoprecipitó una única banda correspondiente al wt EGFR de ambas líneas celulares (Figura 30). El mAb 806 también inmunoprecipitaba una única banda correspondiente a wt EGFR de células tanto U87 MG.wtEGFR como A431 (Figura 30). En concordancia con los datos de FACS y Scatchard, la cantidad de EGFR inmunoprecipitado por mAb 806 era esencialmente menor que el EGFR total presente sobre la superficie celular. Dado que el mAb 806 y el sc-03 inmunoprecipitaban cantidades similares de de2-7 EGFR, este resultado apoya la idea de que el anticuerpo mAb 806 solamente reconoce una porción del EGFR en las células que expresan en exceso el receptor. Las comparaciones entre mAb 806 y el anticuerpo 528 mostraban un patrón de reactividad idéntico (datos no mostrados). Una IgG2b irrelevante (un control de isotipo para mAb 806) no inmunoprecipitaba el EGFR de ninguna de las líneas celulares (Figura 30). Utilizando condiciones idénticas, mAb 806 no inmunoprecipitaba el EGFR de las células U87 MG parentales (datos no mostrados).

Eficacia de mAb 806 en Modelos Preventivos. Se examinó mAb 806 en cuanto a su eficacia contra tumores U87 MG y U87 MG.Δ2-7 en un modelo de xenoinjerto preventivo. Se administró anticuerpo o vehículo i.p. el día antes de la inoculación del tumor y se suministró tres veces por semana durante 2 semanas (véase "Materiales y Métodos"). A una dosis de 1 mg/inyección, el mAb 806 no tenía efecto sobre el crecimiento de xenoinjertos U87 MG parentales que expresan el wt EGFR (Figura 9A). En contraste, mAb 806 inhibía significativamente el crecimiento de xenoinjertos U87 MG.Δ2-7 de una manera dependiente de la dosis (Figura 9B). Veinte días después de la inoculación del tumor, cuando los animales de control fueron sacrificados, el volumen medio del tumor fue de $1600 \pm 180 \text{ mm}^3$ para el grupo de control, significativamente más pequeño, $500 \pm 95 \text{ mm}^3$ para el grupo con 0,1 mg/inyección ($P < 0,0001$) y $200 \pm 42 \text{ mm}^3$ para el grupo con 1 mg/inyección ($P < 0,0001$). Los grupos con tratamiento fueron sacrificados el día 24, en cuyo momento el volumen medio de los tumores fue de $1300 \pm 240 \text{ mm}^3$ para el grupo tratado con 0,1 mg y $500 \pm 100 \text{ mm}^3$ para el grupo con 1 mg ($P < 0,005$).

Eficacia de mAb 806 en Modelos de Xenoinjerto Establecido. Dada la eficacia de mAb 806 en el modelo de xenoinjerto preventivo, se examinó su capacidad para inhibir el crecimiento de los xenoinjertos de tumor establecidos. El tratamiento con anticuerpo fue el descrito en el modelo preventivo, excepto que comenzó cuando los tumores habían alcanzado un volumen medio del tumor de 65 mm^3 (10 días después de la implantación) para los xenoinjertos U87 MG.Δ-7 y de 84 mm^3 (19 días después de la implantación) para los xenoinjertos U87 MG parentales. Una vez más, el mAb 806 no tuvo efecto sobre el crecimiento de los xenoinjertos U87 MG parentales, incluso a una dosis de 1 mg/inyección (Figura 10A). En contraste, mAb 806 inhibió significativamente el crecimiento de los xenoinjertos U87 MG.Δ2-7 de una manera dependiente de la dosis (Figura 10B). El día 17, 1 día antes de que los animales de control fueran sacrificados, el volumen medio del tumor fue de $900 \pm 200 \text{ mm}^3$ para el grupo de control, de $400 \pm 60 \text{ mm}^3$ para el grupo con 0,1 mg/inyección ($P < 0,01$), y de $220 \pm 60 \text{ mm}^3$ para el grupo con 1 mg/inyección ($P < 0,002$). El tratamiento de los xenoinjertos U87 MG.Δ2-7 con control de isotipo IgG2b no tuvo efecto sobre el crecimiento tumoral (datos no mostrados).

Para examinar si la inhibición del crecimiento observada con mAb 806 estaba restringida a las células que expresaban de2-7 EGFR, también se examinó su eficacia contra los xenoinjertos U87 MG.wtEGFR en un modelo establecido. Estas células sirven como modelo para tumores que contienen la amplificación del gen *EGFR* sin la expresión de de2-7 EGFR. El tratamiento con mAb 806 comenzó cuando los tumores habían alcanzado un volumen medio del tumor de 73 mm^3 (22 días después de la implantación). mAb 806 inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos U87 MG.wtEGFR establecidos cuando se comparó con los tumores de control tratados con vehículo (Figura 10C). El

día que los animales de control fueron sacrificados, el volumen medio del tumor era de $1000 \pm 300 \text{ mm}^3$ para el grupo de control y de $500 \pm 80 \text{ mm}^3$ para el grupo tratado con 1 mg/inyección ($P < 0,04$).

5 *Análisis Histológico e Inmunohistoquímico de Tumores Establecidos.* Para evaluar las diferencias histológicas potenciales entre los xenoinjertos U87 MG.Δ2-7 y U87 MG.wtEGFR tratados con mAb 806 y de control, se tiñeron secciones fijadas con formalina, embebidas en parafina con H&E (Figura 31). Se observaron zonas de necrosis en las secciones de los xenoinjertos U87 MG.Δ2-7 tratados con mAb 806 (los xenoinjertos tratados con mAb 806 se recogieron 24 días después de la inoculación del tumor y los xenoinjertos tratados con vehículo a los 18 días), y de U87 MG.wtEGFR (los xenoinjertos con mAb 806 se recogieron 42 días después de la inoculación del tumor y los xenoinjertos tratados con vehículo a los 37 días; Figura 31). Este resultado se observaba sistemáticamente en numerosos xenoinjertos de tumor ($n = 4$ para cada línea celular). Sin embargo, las secciones de xenoinjertos U87 MG.Δ2-7 y U87 MG.wtEGFR tratados con vehículo ($n = 5$) no presentaron la mismas zonas de necrosis después del tratamiento con mAb 806 (Figura 31). Los xenoinjertos tratados con vehículo y mAb 806 separados en momentos idénticos también mostraron estas diferencias en la necrosis tumoral (datos no mostrados). De este modo, el incremento en la necrosis observado no estaba causado por los períodos de crecimiento más largos utilizados para los xenoinjertos tratados con mAb 806. Además, las secciones de los xenoinjertos U87 MG tratados con Mab 806 también se tiñeron con H&E y no revelaron ninguna zona de necrosis (datos no mostrados), apoyando adicionalmente la hipótesis de que la unión a mAb 806 induce una disminución de la viabilidad celular, dando como resultado un aumento de la necrosis en los xenoinjertos de tumor.

20 Se realizó un análisis inmunohistoquímico de secciones de xenoinjerto U87 MG, U87 MG.Δ2-7, y U87 MG.wtEGFR para determinar los niveles de expresión de de2-7 y wt EGFR después del tratamiento con mAb 806 (Figura 32). Como se esperaba, el anticuerpo 528 tiñó todas las secciones de xenoinjerto con una disminución obvia de la intensidad entre los tumores tratados y de control (Figura 32). La tinción de las secciones de U87 MG no fue detectable con el mAb 806; no obstante, se observó una tinción positiva de las secciones de xenoinjerto U87 MG.Δ2-7 y U87 MG.wtEGFR (Figura 32). No hubo diferencia en la intensidad de tinción con mAb 806 entre los xenoinjertos U87 MG.Δ2-7 y U87 MG.wtEGFR de control y tratados, sugiriendo que el tratamiento con anticuerpo no conduce a la selección de variantes clónicas que carecen de reactividad con mAb 806.

30 *Tratamiento de Xenoinjertos A431 con mAb 806.* Para demostrar que los efectos antitumorales de mAb 806 no estaban restringidos a las células U87 MG, se administró el anticuerpo a ratones que contenían xenoinjertos A431. Estas células contienen un gen *EGFR* amplificado y expresan aproximadamente 2×10^6 receptores/célula. Los autores de la presente invención han demostrado previamente que mAb 806 se une a -10% de estos EGFR y localiza los xenoinjertos A431.(3) El mAb 806 inhibía significativamente el crecimiento de los xenoinjertos A431 cuando se examinaba en el modelo de xenoinjerto preventivo descrito previamente (Figura 11A). El día 13, cuando los animales de control fueron sacrificados, el volumen medio del tumor era de $1400 \pm 150 \text{ mm}^3$ en el grupo tratado con vehículo y de $260 \pm 60 \text{ mm}^3$ para el grupo con tratamiento de 1 mg/inyección ($P < 0,0001$). En un experimento separado, una dosis de 0,1 mg de mAb también inhibía significativamente ($P < 0,05$) el crecimiento de los xenoinjertos A431 en un modelo preventivo (datos no mostrados).

40 Dada la eficacia de mAb 806 en el modelo de xenoinjerto A431 preventivo, se examinó su capacidad para inhibir el crecimiento de xenoinjertos de tumor establecidos. El tratamiento con anticuerpo fue el descrito en el modelo preventivo, excepto que no comenzó hasta que los tumores hubieron alcanzado un volumen medio del tumor de $200 \pm 20 \text{ mm}^3$. El mAb 806 inhibió significativamente el crecimiento de los xenoinjertos A431 establecidos (Figura 11B). El día 13, el día que los animales de control fueron sacrificados, el volumen medio del tumor fue de $1100 \pm 100 \text{ mm}^3$ para el grupo de control y de $450 \pm 70 \text{ mm}^3$ para el grupo con 1 mg/inyección ($P < 0,0001$).

50 Los autores de la presente invención han demostrado previamente³ que mAb 806 localiza tanto los xenoinjertos U87 MG transfectados con de2-7 EGFR como los xenoinjertos A431 que expresan en exceso el wt EGFR. El mAb 806 no localizó las células U87 MG parentales, que expresan $\sim 10^5$ EGFR³ (16). Como se evaluó mediante FACS, inmunohistoquímica, e inmunoprecipitación, los autores de la presente invención demuestran ahora que mAb 806 también es capaz de unirse específicamente a células U87 MG.wtEGFR, que expresan $>10^6$ EGFR/célula. De este modo, la unión anterior observada de mAb 806 a las células A431 no es el resultado de alguna propiedad inusual de estas células si no más bien parece ser un fenómeno más general relacionado con la expresión en exceso de wt EGFR.

55 (a) Los autores de la presente invención fueron incapaces de detectar la unión de mAb 806 a la línea celular U87 MG parental, que expresa 1×10^5 wt EGFR/célula (16), ya sea mediante FACS, inmunoprecipitación, inmunohistoquímica, o con anticuerpo yodado. En efecto, el mAb 806 yodado no se unía a sedimentos de células U87 MG que contenían 1×10^7 células, que basándose en los datos de Scatchard utilizando 1×10^6 células A431, son condiciones que deben detectar un bajo nivel de unión del anticuerpo (esto es, siendo el número total de receptores similar en ambos casos).

60 (b) El análisis Scatchard demostró claramente que mAb 806 solamente se unía al 10% del EGFR total sobre la superficie de las células A431. Si mAb 806 se une simplemente al wt EGFR con una baja afinidad, se debe haber unido a un porcentaje considerablemente mayor del receptor.

(c) La inmunoprecipitación comparativa de las líneas celulares A431 y U87 MG. wtEGFR con mAb 806 y el anticuerpo sc-03 también apoyó la hipótesis de que solamente un subgrupo de receptores son reconocidos por mAb 806.

Tomados juntos, estos resultados apoyan la idea de que mAb 806 reconoce un subgrupo de EGFR sobre la superficie de las células que expresan EGFR en exceso. Los autores de la presente invención están analizando actualmente el EGFR inmunoprecipitado por mAb 806 para ver si presenta propiedades bioquímicas alteradas relacionadas con la glicosilación o la actividad quinasa.

5 Los estudios de xenoinjertos con mAb 806 descritos aquí demuestran una inhibición dependiente de la dosis del crecimiento del xenoinjerto U87 MG.D2-7. En contraste, no se observó inhibición de los xenoinjertos U87 MG parentales, a pesar del hecho de que continúan expresando el wt EGFR *in vivo*. El mAb 806 no sólo redujo significativamente el volumen del xenoinjerto, también indujo una necrosis significativa en el tumor. Como se ha observado antes, se han
10 generado otros mAb específicos de de2-7 EGFR (20 -22), pero este es el primer informe que demuestra el uso terapéutico satisfactorio de semejante anticuerpo *in vivo* contra un xenoinjerto de glioma que expresa de2-7 EGFR humano. Un informe reciente demostró que el mAb Y10 específico de de2-7 EGFR tenía una actividad antitumoral *in vivo* contra las células de melanoma B16 murino transfectadas con un homólogo murino del de2-7 EGFR humano (33). Y10 mediaba la lisis celular *in vitro* (>90%) de células de melanoma B16 que expresaban de2-7 EGFR en ausencia
15 de células del complemento o efectoras. En contraste con sus observaciones *in vitro*, la eficacia del anticuerpo Y10 *in vivo* estaba mediada completamente por la función de Fc cuando se utilizaban células de melanoma B16 desarrolladas como xenoinjertos en un modelo inmuno-competente. De este modo, los efectos directos observados *in vitro* no parecen repetirse cuando las células se desarrollan como xenoinjertos tumorales.

20 La expresión en exceso del EGFR ha sido referida en numerosos tumores diferentes y se observa en la mayor parte de los gliomas (4, 14). Se ha propuesto que la posterior expresión en exceso de EGFR mediada por la amplificación del gen del receptor puede conferir una ventaja de crecimiento aumentando la señalización intracelular y el crecimiento celular (34). Se transfectó la línea celular U87 MG con wt EGFR para producir una célula de glioma que imita el proceso de amplificación del gen *EGFR*. El tratamiento de los xenoinjertos U87 MG.wtEGFR establecidos con
25 mAb 806 dio como resultado una inhibición del crecimiento significativa. De este modo, mAb 806 también media la actividad antitumoral *in vivo* contra células que expresan el EGFR en exceso. De manera interesante, la inhibición por mAb 806 de los xenoinjertos U87 MG.wtEGFR fue menos pronunciada que la observada con los tumores U87 MG.Δ2-7. Esto refleja probablemente el hecho de que mAb 806 tiene una afinidad inferior por el wt EGFR expresado en exceso y solamente se une a una pequeña proporción de receptores expresados sobre la superficie de la célula.(3) No
30 obstante, se debe observar que a pesar del pequeño efecto sobre los volúmenes de los xenoinjertos U87 MG.wtEGFR, el tratamiento con mAb 806 produjo grandes zonas de necrosis en estos xenoinjertos. Para excluir la posibilidad de que mAb 806 solamente medie la inhibición de las líneas celulares derivadas de U87 MG, los autores de la presente invención sometieron a ensayo su eficacia frente a xenoinjertos A431. Esta línea celular derivada de carcinoma de células escamosas contiene una amplificación del gen *EGFR* significativa, que se conserva tanto *in vitro* como *in vivo*. El tratamiento de los xenoinjertos A431 con mAb 806 produjo una inhibición del crecimiento significativa en el
35 modelo tanto preventivo como establecido, indicando que los efectos antitumorales de mAb 806 no están restringidos a las líneas celulares U87 MG transfectadas.

40 La prevención completa del crecimiento del xenoinjerto A431 por el tratamiento con anticuerpo ha sido referida previamente. Los mAb para wt EGFR 528, 225, y 425 evitaban todos la formación de xenoinjertos A431 cuando se administraban el día o 1 día después de la inoculación del tumor (9, 10). La razón de esta diferencia en la eficacia entre estos anticuerpos para wt EGFR y mAb 806 no se conoce, pero puede estar relacionada con el mecanismo de inhibición del crecimiento celular. Los anticuerpos para wt EGFR funcionan bloqueando la unión del ligando al EGFR, pero este probablemente no es el caso con mAb 806 puesto que solamente se une a un pequeño subgrupo de EGFR
45 sobre la superficie de las células A431. La eficacia significativa de mAb 806 contra las células U87 MG que expresan el de2-7 EGFR independiente del ligando apoya la idea de que este anticuerpo media su actividad antitumoral por un mecanismo que no implica el bloqueo del ligando. Por lo tanto, los autores de la presente invención están investigando en la actualidad los mecanismos no inmunológicos e inmunológicos que contribuyen a los efectos antitumorales de mAb 806- Los mecanismos no inmunológicos pueden incluir cambios sutiles, bloqueo de la señalización, o inducción
50 de una señalización inapropiada.

Previamente, agentes tales como doxorubicina y cisplatino junto con anticuerpos para wt EGFR han producido un aumento de la actividad antitumoral (35, 36). La combinación de doxorubicina y mAb 528 produjo una erradicación total de los xenoinjertos A431 establecidos, mientras el tratamiento con cualquier agente solo causaba únicamente una
55 inhibición temporal del crecimiento tumoral *in vivo* (36). Del mismo modo, la combinación de cisplatino y cualquier mAb 528 o 225 también condujo a la erradicación de xenoinjertos A431 bien establecidos, que no se observó cuando se utilizó el tratamiento con cualquier agente (35). De este modo, se planean futuros estudios que implican la combinación de agentes quimioterapéuticos con mAb 806 utilizando modelos de xenoinjerto.

60 Puede que la ventaja más importante de mAb 806 en comparación con los anticuerpos para EGFR actuales sea que es posible conjugar directamente agentes citotóxicos a mAb 806. Este enfoque no es factible con los anticuerpos específicos para EGFR actuales debido a que se dirigen al hígado y la conjugación citotóxica induciría casi con certeza una toxicidad grave. La conjugación de agentes citotóxicos tales como fármacos (37) o radioisótopos (38) a anticuerpos tiene el potencial de mejorar la eficacia y reducir la toxicidad generalizada de estos agentes. Este estudio demuestra
65 claramente que mAb 806 tiene una actividad antitumoral *in vivo* significativa contra los xenoinjertos positivos para de2-7 EGFR y los tumores que expresan EGFR en exceso. La especificidad única de mAb 806 sugiere un potencial inmunoterapéutico en la localización de numerosos tipos de tumores, concretamente tumores de cabeza y cuello y glioma, sin las restricciones asociadas con la absorción por los tejidos normales.

Referencias

1. **Scott, A. M., y Welt, S.** Antibody-based immunological therapies. *Curr. Opin. Immunol.*, 9: 717-722, 1997.
- 5 2. **Fan, Z., y Mendelsohn, J.** Therapeutic application of anti-growth factor receptor antibodies. *Curr. Opin. Oncol.*, 10: 67-73, 1998.
3. **Garcia de Palazzo, I. E., Adams, G. P., Sundareshan, P., Wong, A. J., Testa, J. R., Bigner, D. D., y Weiner, L. M.** Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res.*, 53: 3217-3220, 1993.
- 10 4. **Wikstrand, C. J., Reist, C. J., Archer, G. E., Zalutsky, M. R., y Bigner, D. D.** The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. *J. Neurovirol.*, 4: 148-158, 1998.
- 15 5. **Korshunov, A., Golanov, A., Sycheva, R., y Pronin, I.** Prognostic value of tumor associated antigen immunoreactivity and apoptosis in cerebral glioblastomas: an analysis of 168 cases. *J. Clin. Pathol.*, 52: 574-580, 1999.
- 20 6. **Grands, J. R., Melhem, M. F., Cooding, W. E., Day, R., Holst, V. A., Wagener, M. M., Drenning, S. D., y Tweardy, D. J.** Levels of TGF- α y BGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J. Natl. Cancer Inst.*, 90: 824-832, 1998.
- 25 7. **Fan, Z., Masui, H., Altas, L., y Mendelsohn, J.** Blockade of epidermal growth factor receptor function by bivalent and monovalent fragments of 225 anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res.*, 53: 4322-4328, 1993.
8. **Teramoto, T., Onda, M., Tokunaga, A., y Asano, G.** Inhibitory effect of anti-epidermal growth factor receptor antibody on a human gastric cancer. *Cancer (Phila.)*, 77: 1639-1645, 1996.
- 30 9. **Rodeck, U., Herlyn, M., Herlyn, D., Molthoff, C., Atkinson, B., Varello, M., Steplewski, Z., y Koprowski, H.** Tumor growth modulation by a monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor: immunologically mediated and effector cell-independent effects. *Cancer Res.*, 47: 3692-3696, 1987.
- 35 10. **Masui, H., Kawamoto, T., Sato, J. D., Wolf, B., Sato, G., y Mendelsohn, J.** Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res.*, 44: 1002-1007, 1984.
- 40 11. **Faillot, T., Magdelenat, H., Mady, E., Stasiecki, P., Fohanno, D., Gropp, P., Poisson, M., y Delattre, J. Y.** A Phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas. *Neurosurgery*, 39: 478-483, 1996.
- 45 12. **Divgi, C. R., Welt, S., Kris, M., Real, F. X., Yeh, S. D., Gralla, R., Merchant, B., Schweighart, S., Unger, M., Larson, S. M., et al.** Phase I and imaging trial of indium 111-labeled anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 in patients with squamous cell lung carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 83: 97-104, 1991.
- 50 13. **Baselga, J., Pfister, D., Cooper, M. R., Cohen, R., Burtness, B., Bos, M., D'Andrea, G., Seidman, A., Norton, L., Gunnett, K., Falcey, J., Anderson, V., Waksal, H., y Mendelsohn, J.** Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin. *J. Clin. Oncol.*, 18: 904, 2000.
- 55 14. **Voldborg, B. R., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M., y Poulsen, H. S.** Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann. Oncol.*, 8: 1197-1206, 1997.
15. **Sugawa, N., Ekstrand, A. J., James, C. D., y Collins, V. P.** Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 8602-8606, 1990.
- 60 16. **Nishikawa, R., Ji, X. D., Harmon, R. C., Lazar, C. S., Gill, G. N., Cavenee, W. K., y Huang, H. J.** A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 7727-7731, 1994.
- 65 17. **Tang, C. K., Gong, X. Q., Moscatello, D. K., Wong, A. J., y Lippman, M. E.** Epidermal growth factor receptor vIII enhances tumorigenicity in human breast cancer. *Cancer Res.*, 60: 3081-3087, 2000.
18. **Olapade-Olaopa, E. O., Moscatello, D. K., MacKay, E. H., Horsburgh, T., Sandhu, D. P., Terry, T. R., Wong, A. J., y Habib, F. K.** Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. *Br. J. Cancer*, 82: 186-194, 2000.

19. **Moscato**, D. K., **Holgado-Madruga**, M., **Godwin**, A. K., **Ramirez**, G., **Gunn**, G., **Zoltick**, P. W., **Biegel**, J. A., **Hayes**, R. L., y **Wong**, A. J. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res.*, 55: 5536-5539, 1995.
- 5 20. **Wikstrand**, C. J., **Hale**, L. P., **Batra**, S. K., **Hill**, M. L., **Humphrey**, P. A., **Kurpad**, S. N., **McLendon**, R. E., **Moscato**, D., **Pegram**, C. N., **Reist**, C. J., *et al.* Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Cancer Res.*, 55: 3140-3148, 1995.
- 10 21. **Hills**, D., **Rowlinson-Busza**, G., y **Gullick**, W. J. Specific targeting of a mutant, activated FGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody. *Int. J. Cancer*, 63: 537-543, 1995.
- 15 22. **Okamoto**, S., **Yoshikawa**, K., **Obata**, Y., **Shibuya**, M., **Aoki**, S., **Yoshida**, J., y **Takahashi**, T. Monoclonal antibody against the fusion junction of a deletion-mutant epidermal growth factor receptor. *Br. J. Cancer*, 73: 1366-1372, 1996.
- 20 23. **Nagane**, M., **Coufal**, F., **Lin**, H., **Bogler**, O., **Cavenee**, W. K., y **Huang**, H. J. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res.*, 56: 5079-5086, 1996.
- 25 24. **Sato**, J. D., **Le**, A. D., y **Kawamoto**, T. Derivation and assay of biological effects of monoclonal antibodies to epidermal growth factor receptors. *Methods Enzymol.*, 146: 63-81, 1987.
- 30 25. **Huang**, H. S., **Nagane**, M., **Klingbeil**, C. K., **Lin**, H., **Nishikawa**, R., **Ji**, X. D., **Huang**, C. M., **Gill**, G. N., **Wiley**, H. S., y **Cavenee**, W. K. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine fosforylation and unattenuated signaling. *J. Biol. Chem.*, 272: 2927-2935, 1997.
- 35 26. **Clarke**, K., **Lee**, F. T., **Brechbiel**, M. W., **Smyth**, F. E., **Old**, L. J., y **Scott**, A. M. Therapeutic efficacy of anti-Lewis(y) humanized 3S193 radioimmunotherapy in a breast cancer model: enhanced activity when combined with Taxol chemotherapy. *Clin. Cancer Res.*, 6: 3621-3628, 2000.
- 40 27. **Atlas**, L., **Mendelsohn**, J., **Baselga**, J., **Fair**, W. R., **Masui**, H., y **Kumar**, R. Growth regulation of human renal carcinoma cells: role of transforming growth factor a. *Cancer Res.*, 52: 3335-3339, 1992.
- 45 28. **Perez-Soler**, R., **Donato**, N. J., **Shin**, D. M., **Rosenblum**, M. G., **Zhang**, H. Z., **Tomos**, C., **Brewer**, H., **Chan**, J. C., **Lee**, J. S., **Hong**, W. K., *et al.* Tumor epidermal growth factor receptor studies in patients with non-small-cell lung cancer o head and neck cancer treated with monoclonal antibody RG 83852. *J. Clin. Oncol.*, 12: 730-739, 1994.
- 50 29. **Wersall**, P., **Ohlsson**, I., **Biberfeld**, P., **Collins**, V. P., von **Krusenstjerna**, S., **Larsson**, S., **Mellstedt**, H., y **Boethius**, J. Intratumoral infusion of the monoclonal antibody, mAb 425, against the epidermal-growth-factor receptor in patients with advanced malignant glioma. *Cancer Immunol. Immunother.*, 44: 157-164, 1997.
- 55 30. **Brady**, L. W., **Miyamoto**, C., **Woo**, D. V., **Rackover**, M., **Emrich**, J., **Bender**, H., **Dadparvar**, S., **Steplewski**, Z., **Koprowski**, H., **Black**, P., *et al.* Malignant astrocytomas treated with iodine-125 labeled monoclonal antibody 425 against epidermal growth factor receptor: a Phase II trial. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 22: 225-230, 1992.
31. **Reist**, C. J., **Archer**, G. E., **Kurpad**, S. N., **Wikstrand**, C. J., **Vaidyanathan**, G., **Willingham**, M. C., **Moscato**, D. K., **Wong**, A. J., **Bigner**, D. D., y **Zalutsky**, M. R. Tumor-specific anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibodies: use of the tyramine-cellobiose radioiodination method enhances cellular retention and uptake in tumor xenografts. *Cancer Res.*, 55: 4375-4382, 1995.
32. **Reist**, C. J., **Archer**, G. E., **Wikstrand**, C. J., **Bigner**, D. D., y **Zalutsky**, M. R. Improved targeting of an anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody in tumor xenografts after labeling using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridin-carboxylate. *Cancer Res.*, 57: 1510-1515, 1997.
33. **Sampson**, J. H., **Crotty**, L. E., **Lee**, S., **Archer**, G. E., **Ashley**, D. M., **Wikstrand**, C. J., **Hale**, L. P., **Small**, C., **Dranoff**, G., **Friedman**, A. 1-1, **Friedman**, H. S., y **Bigner**, D. D. Unarmed, tumor-specific monoclonal antibody effectively treats brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 7503-7508, 2000.
34. **Filmus**, J., **Trent**, J. M., **Pollak**, M. N., y **Buick**, R. N. Epidermal growth factor receptor gene-amplified MDA-468 breast cancer cell line and its nonamplified variants. *Mol. Cell. Biol.*, 7: 251-257, 1987.
35. **Fan**, Z., **Baselga**, J., **Masui**, H., y **Mendelsohn**, J. Antitumor effect of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies plus cis-diamminedichloroplatinum on well established A431 cell xenografts. *Cancer Res.*, 53: 4637-4642, 1993.

36. **Baselga, J., Norton, L., Masui, H., Pandiella, A., Coplan, K., Miller, W. H., Jr., y Mendelsohn, J.** Antitumor effects of doxorubicin in combination with anti-epidannal growth factor receptor monoclonal antibodies. *J. Natl. Cancer Inst.*, 85: 1327-1333, 1993.

5 37. **Trail, P. A., y Bianchi, A. B.** Monoclonal antibody drug conjugates in the treatment of cancer. *Curr. Opin. Immunol.*, 11: 584-588, 1999.

38. **DeNardo; S. J., Kroger, L. A., y DeNardo, G. L.** A new era for radiolabeled antibodies in cancer? *Curr. Opin. Immunol.*, 11: 563-569, 1999.

10

Ejemplo 21

Construcción, expresión y análisis de anticuerpo quimérico 806

15

Los anticuerpos quiméricos son una clase de moléculas en las que regiones variables de cadenas pesadas y ligeras por ejemplo de ratón, rata u otra especie se unen sobre regiones de cadenas pesadas y ligeras humanas. Los anticuerpos quiméricos son producidos recombinantemente. Una ventaja de los anticuerpos quiméricos es que reducen los efectos xenoantigénicos, la inmunogenicidad inherente de los anticuerpos no humanos (por ejemplo, ratón, rata u otra especie). Además, los anticuerpos quiméricos preparados recombinantemente pueden ser producidos a menudo en grandes cantidades, concretamente cuando se utilizan vectores con un elevado nivel de expresión.

20

Para una producción de alto nivel, el sistema de expresión en mamíferos más ampliamente utilizado es uno que utiliza el procedimiento de amplificación génica ofrecido por las células de ovario de hámster Chino carentes de deshidrofolato reductasa (“dhfr-”). El sistema es bien conocido por los expertos en la técnica. El sistema se basa en el gen de la deshidrofolato reductasa “dhfr”, que codifica la enzima DHFR, que cataliza la conversión de deshidrofolato en tetrahidrofolato. Con el fin de lograr una producción elevada, se transfectan células CHO dhfr- con un vector de expresión que contiene un gen DHFR funcional, junto con un gen que codifica una proteína deseada. En este caso, la proteína deseada es una cadena pesada y/o una cadena ligera de anticuerpo recombinante.

30

Aumentando la cantidad de inhibidor competitivo de DHFR metotrexato (MTX), las células recombinantes desarrollan resistencia amplificando el gen dhfr. En casos convencionales, la unidad de amplificación empleada es mucho mayor que el tamaño del gen dhfr, y como resultado la cadena pesada del anticuerpo es amplificada simultáneamente.

35

Cuando se desea la producción a gran escala de la proteína, tal como la cadena de anticuerpo, tanto el nivel de expresión como la estabilidad de las células que se están empleando, resultan críticos. En cultivos a largo plazo, las poblaciones de células CHO recombinantes pierden homogeneidad con respecto a su productividad de anticuerpos específicos durante la amplificación, incluso aunque deriven de un único clon parental.

40

Se prepararon vectores de expresión bicistrónicos para su uso en la expresión recombinante de los anticuerpos quiméricos. Estos vectores de expresión bicistrónicos, emplean un “sitio de de entrada al ribosoma interno” o “IRES”. En estos constructos para la producción de antiEGFR quimérico, las cadenas de inmunoglobulina y los ADNc marcadores seleccionable están unidos por un IRES. Los IRES son elementos que actúan en cis que reclutan las subunidades ribosómicas pequeñas para un codón iniciador interno en el ARNm con la ayuda de factores celulares que actúan en trans. Los IRES facilitan la expresión de dos o más proteínas de una unidad de transcripción policistrónica en las células eucarióticas. El uso de vectores de expresión bicistrónicos en los que el gen marcador seleccionable es traducido de una manera dependiente de la protección terminal, y el gen de interés de una manera dependiente de IRES, ha sido aplicado a una variedad de métodos experimentales. Los elementos IRES han sido incorporados satisfactoriamente a vectores para la transformación celular, la producción de animales transgénicos, la producción de proteína recombinante, la terapia génica, la captura de genes, y la localización de genes.

50

Sinopsis de la Construcción del Anticuerpo Quimérico 806 (ch806)

55

El anticuerpo quimérico 806 fue generado clonando la VH y la VL del anticuerpo 806 del hibridoma murino parental utilizando técnicas de biología molecular convencionales. Después se clonaron la VH y la VL en vectores de expresión de mamífero pREN, cuya construcción se expone en los SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, y se transfectaron en células CHO (DHFR -/-ve) para la amplificación y la expresión. En resumen, después del tratamiento con tripsina se co-transfectaron 4×10^6 células CHO con $10 \mu\text{g}$ de cada uno de los vectores de expresión LC y HC utilizando la electroporación en condiciones convencionales. Después de un período de descanso de 10 min a la temperatura ambiente, se añadieron las células a 15 ml de medio (suero de ternera fetal al 10%, con un suplemento de hipoxantina/timidina con aditivos) y se transfirieron a placas petri para el cultivo de tejidos de 15×10 cm. Después las placas se colocaron en la incubadora en condiciones normales durante 2 días. En este punto, la adición de gentamicina, metotrexato 5 nM, la reposición de suero de ternera fetal por suero de ternera fetal sometido a diálisis y la separación de la hipoxantina/timidina, iniciaron la selección de clones que se habían transfectado satisfactoriamente tanto con LC como HC del medio. El día 17 después de la transfección, se seleccionaron los clones individuales que crecían bajo la selección y se escrutaron en busca de la expresión del anticuerpo 806 quimérico. Se utilizó un ELISA para el escrutinio y consistió en el recubrimiento de la placa de ELISA con receptor de EGF soluble desnaturalizado (se sabe que el EGFR desnaturalizado permite la unión a 806). Este análisis permite el escrutinio de los niveles de producción por los clones

65

ES 2 334 494 T3

individuales y también la funcionalidad del anticuerpo que está siendo escrutado. Se demostró que todos los clones estaban produciendo ch806 funcional y se tomó el mejor productor y se expandió para la amplificación. Para amplificar el nivel de ch806 que estaba siendo producido, se sometió el clon con la producción más alta a una re-selección bajo una concentración de metotrexato superior (100 nM vs 5 nM). Esto se acometió utilizando los procedimientos mencionados antes.

Después se analizaron los clones que crecían con MTX 100 nM en Biological Production Facility, Ludwig Institute, Melbourne, Australia para medir los niveles de producción, se fue quitando el suero, formándose bancos de células. Se ha demostrado que la línea celular produce establemente ~10 mg/litro en botellas giratorias.

La secuencia de ácido nucleico del vector pREN ch806 LC neo se proporciona en el SEQ ID NO: 7. La secuencia de ácido nucleico del vector pREN ch806 HC DHFR se proporciona en el SEQ ID NO: 8.

La Figura 33 representa los vectores pREN-HC y pREN-LC, que emplean IRES. El sistema vector bicistrónico pREN se describe y se revela en el documento co-pendiente U.S.S.N. 60/355.838 presentado el 13 de Febrero de 2002.

Se evaluó Ch806 mediante análisis FACS para demostrar que el 806 quimérico presenta una especificidad de unión idéntica a la del anticuerpo parental murino. El análisis se realizó utilizando células de tipo salvaje (células parentales U87 MG), células que expresaban el receptor EGP en exceso (células A431 y células UA87 wt EGFR) y células UA87 $\Delta 2-7$ (datos no mostrados). Se obtuvo una especificidad de unión similar de Mab806 y ch806 utilizando células que expresaban EGFR en exceso y células que expresaban de2-7 EGFR. No se observó unión en células de tipo salvaje. El análisis Scatchard reveló una afinidad de unión para ch806 marcado radiactivamente de $6,4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ utilizando células U87MGde2-7 (datos no mostrados).

El análisis de la biodistribución del anticuerpo ch806 se realizó en ratones BALB/c carentes de sistema inmunitario que portaban tumores por xenoinjerto U87MG-de2-7 y los resultados se muestran en la Figura 34. Se inyectaron a los ratones $5 \mu\text{g}$ de anticuerpo radiomarcado y se sacrificaron en grupos de cuatro por momento puntual a las 8, 24, 48 y 74 horas. Se recogieron los órganos, se pesaron y se midió la radiactividad en un contador gamma. El ch806 marcado con I^{125} presenta localización reducida del tumor en comparación con ch806 marcado con In^{111} , que tiene una absorción por el tumor elevada y una retención acumulativa por el tumor a lo largo de un período de tiempo de 74 horas. A las 74 horas, el anticuerpo marcado con In^{111} presenta aproximadamente 30% de DI/gramo de tejido y una razón de tumor con respecto a sangre de 4,0 (Figura 35). El ch806 marcado con In^{111} muestra cierta retención no específica en el hígado, bazo y riñones. Esto es común para el uso de este isótopo y disminuye con el tiempo, lo que apoya que esta unión no es específica para ch806 y se debe a la unión a In^{111} .

Se evaluó el anticuerpo quimérico ch806 en cuanto a su eficacia terapéutica en un modelo tumoral establecido. Se inocularon 3×10^6 U87MG. $\Delta 2-7$ células en $100 \mu\text{l}$ de PBS s.c. en ambos flancos de ratones hembra carentes de sistema inmunitario de 4-6 semanas de edad (Aminal Research Center, Western Australia, Australia). El mAb 806 se incluyó como control positivo. Los resultados se representan en la Figura 36. El tratamiento se inició cuando los tumores habían alcanzado un volumen medio de 50 mm^3 y consistió en 1 mg de ch806 o mAb806 administrado i.p. durante un total de 5 inyecciones los días indicados. Se determinó el volumen en mm^3 utilizando la fórmula ($\text{longitud} \times \text{anchura}^2$)/2, donde la longitud era el eje más largo y la anchura la medida en los ángulos rectos con respecto a la longitud. Los datos se expresaron como el volumen medio del tumor +/- D.T. para cada grupo de control. El ch806 y el mAb 806 presentaron una actividad anti-tumoral casi idéntica contra xenoinjertos U87MG. $\Delta 2-7$.

Análisis de la Función Efectora Inmune de Ch806

Materiales y Métodos

Anticuerpos y Líneas celulares

El mAb monoclonal anti-de2-7 EGFR murino mAb 806, el anticuerpo quimérico ch806 (IgG₁) y el anticuerpo monoclonal anti-G250 quimérico del mismo isotipo de control cG250 fueron preparados por Biological Production Facility, Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne, Australia. Los análisis tanto de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) como de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) utilizaron células U87MG.de2-7 y A431 como células diana. La línea celular U87MG.de2-7 descrita previamente es una línea celular de astrocitoma infectada con un retrovirus que contiene de2-7EGFR (Nishikawa, R. *et al.* (1994) Proc Natl Acad Sci U S A. 91: 7727-31). Las células de carcinoma escuamoso humano A431 fueron adquiridas de la Colección de Cultivos tipo Americana (Manassas, VA). Todas las líneas celulares se cultivaron en DMEM/F-12 con Glutamax[®] (Life Technologies, Melbourne, Australia) con un suplemento de FCS inactivado con calor al 10% (CSL, Melbourne, Australia), 100 unidades/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin. Para mantener la selección para las células U87MG.de2-7 transfectadas retroviralmente se incluyeron 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de G418 en el medio.

Preparación de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) Células Efectoras

Se aislaron PBMC de sangre de donantes voluntarios sanos. La sangre completa heparinizada se fraccionó mediante centrifugación en gradiente de densidad sobre Ficoll-Hypaque (ICN Biomedical Inc., Ohio, USA). Se recogieron

ES 2 334 494 T3

fracciones de PBMC y se lavaron tres veces con RPMR 1640 con un suplemento de 100 U/ml de penicilina y 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina, L-glutamina 2 mM, que contenía FCS inactivado con calor al 5%.

Preparación de Células Diana

5 Se realizaron análisis de CDC y ADCC mediante una modificación de un método publicado previamente ((Nelson, D. L. *et al.* (1991) In: J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. D. Margulies, E. M. Shevach, y W. Strober (eds.), Current Protocols in Immunology, pp. 7.27.1. New York: Greene Publishing Wiley Interscience). Brevemente, se marcaron 5×10^6 células U87MG.de2-7 y A431 diana con 50 μCi de Cr^{51} (Geneworks, Adelaide, Australia) por 1×10^6 células y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Las células se lavaron después con PBS (0,05 M, pH 7,4) y un cuarto lavado con medio de cultivo. Se añadieron alícuotas (1×10^4 células/50 μl) de las células marcadas a cada pocillo de las placas de microtitulación de 96 pocillos (NUNC, Roskilde, Denmark).

Análisis de CDC

15 A 50 μl de células diana marcadas, se añadieron 50 μl de ch806 o anticuerpo de control del isotipo cG250 por triplicado a lo largo de un intervalo de concentración de 0,00315 -10 $\mu\text{g/ml}$, y se incubaron sobre hielo 5 min. Después se añadieron 50 μl de complemento de donante sano recién preparado (suero) para producir una dilución final de 1:3 del suero. Las placas de microtitulación se incubaron durante 4 hr a 37°C. Después de la centrifugación, se contó el Cr^{51} liberado al sobrenadante (Contador Gamma automatizado Cobra II, Canberra Packard, Melbourne, Australia). Se calculó el porcentaje de lisis específica a partir de la liberación de Cr^{51} experimental, la liberación total (50 μl de células diana + 100 μl de Tween 20 al 10%) y espontánea (50 μl de células diana + 100 μl de medio).

Análisis de ADCC

25 Se midió la ADVV mediada por Ch806 efectuada por PBMC de donante sano mediante dos análisis de liberación de Cr^{51} de 4 horas. En el primer análisis, se cultivaron en placa las células diana marcadas con las células efectoras en microplacas de fondo en "U" de 96 pocillos (NUNC, Roskilde, Denmark) a razones de células efectoras/diana (E:D) de 50:1. Para las medidas de la actividad ADCC, se añadieron 0,00315-10 $\mu\text{g/ml}$ (concentración final) de anticuerpos de ensayo y de control por triplicado a cada pocillo. En el segundo análisis de ADCC, se comparó la actividad ADCC de ch806 con la del mAb murino parental 806 a lo largo de un intervalo de razones de células Efectoras: Diana con la concentración de anticuerpo de ensayo constante a 1 $\mu\text{g/ml}$. En ambos análisis, se incubaron placas de microtitulación a 37°C durante 4 horas, después se recogieron 50 μl de sobrenadante de cada pocillo y se determinó el Cr^{51} liberado mediante recuento gamma (Contador Gamma automatizado Cobra II, Canberra Packard, Melbourne, Australia). Los controles incluidos en los análisis corrigieron la liberación espontánea (medio solo) y la liberación total (Tween 20/PBS al 10%). Los controles apropiados con los anticuerpos de la misma subclase se realizaron en paralelo.

El porcentaje de lisis celular (citotoxicidad) se calculó de acuerdo con la fórmula:

$$\text{Porcentaje de Citotoxicidad} = \frac{\text{Cuentas de la Muestra} - \text{Liberación espontánea}}{\text{Liberación Total} - \text{Liberación Espontánea}} \times 100$$

El porcentaje (%) de citotoxicidad se trazó frente a la concentración de anticuerpo ($\mu\text{g/ml}$).

Resultados

50 Los resultados de los análisis de CDC se presentan en la Figura 37. La actividad CDC mínima se observó en presencia de hasta 10 $\mu\text{g/ml}$ de ch806 con una CDC comparable a la observada con el control de isotipo cG250.

55 La ADCC mediada por Ch806 sobre las células U87MG.de2-7 y A431 diana a una razón E:D de 50:1 se presenta en la Figura 38. La citotoxicidad específica de ch806 se presentó frente a células U87MG.de2-7 diana, pero la ADCC mínima estaba mediada por ch806 sobre las células A431. Los niveles de citotoxicidad logrados reflejan el número de sitios de unión de ch806 en las dos poblaciones de células. Las células U87MG.de2-7 diana expresan 1×10^6 de-7EGFR que son reconocidos específicamente por ch806, mientras solamente un subgrupo de 1×10^6 moléculas de EGFR de tipo salvaje expresadas sobre las células A431 son reconocidas por ch806 (véanse los Ejemplos anteriores).

60 Se realizaron análisis de ADCC adicionales para comparar la ADCC mediada por 1 $\mu\text{g/ml}$ de ch806 sobre las células U87MG.de2-7 diana con la efectuada por 1 $\mu\text{g/ml}$ de mAb 806 murino parental. Los resultados se presentan en la Figura 39. La quimerización de mAb 806 ha llevado a cabo una mejora notable de la ADCC obtenida por el mAb murino parental con una citotoxicidad de más del 30% efectuada a razones E:D de 25:1 y 50:1.

65 La carencia de función efectora del mAb murino parental 806 ha sido notablemente mejorada tras la quimerización. Ch806 media una buena ADCC, pero una actividad CDC mínima.

Ejemplo 22

Generación de anticuerpos anti-idiotípicos contra el anticuerpo quimérico ch806

5 Para ayudar a la evaluación clínica de mAb806 o ch806, se requieren ensayos de laboratorio para verificar las farmacocinéticas en suero de los anticuerpos y cuantificar cualquier respuesta inmunitaria contra el anticuerpo quimérico de ratón-humano. Se generaron y caracterizaron anticuerpos anti-idiotípicos monoclonales de ratón (anti-ids) en busca de la idoneidad como reactivos de ELISA para medir ch806 en muestras de sueros de pacientes y utilizarlos como controles positivos en análisis de la respuesta inmunitaria anti-anticuerpo quimérico humano. Estos anticuerpos anti-idiotípicos pueden ser también útiles como vacunas terapéuticas o profilácticas, generando una respuesta de anticuerpo anti-EGFR natural en los pacientes.

15 Los métodos para generar anticuerpos anti-idiotípicos son bien conocidos en la técnica (Bhattacharya-Chatterjee, Chatterjee *et al.* 2001, Uemura *et al.* 1994, Steffens, Boerman *et al.* 1997, Safa and Foon 2001, Brown and Ling 1988).

20 Los anticuerpos anti-idiotípicos monoclonales de ratón (anti-ids) fueron generados, brevemente, como sigue. Se fusionaron esplenocitos de ratones inmunizados con ch806 con células de plasmacitoma SP2/0-AG14 y los hibridomas que producen anticuerpos se seleccionaron a través de ELISA en busca de la unión específica a ch806 y la unión competitiva para el antígeno (Figura 40). Se seleccionaron inicialmente veinticinco hibridomas y cuatro, designados LMH-11, -12 -13 y -14, anticuerpos secretados que demostraron unión específica a ch806, mAb 806 y fueron capaces de neutralizar la actividad de unión al antígeno ch806 o mAb 806 (Figura 41). El reconocimiento del idiotipo ch806/mAb 806 o de la región CDR se demostró por la carencia de reactividad cruzada con la IgG humana policlonal purificada.

25 En ausencia de de2-7 EGFR antigénico recombinante fácilmente asequible para ayudar a la determinación de ch806 en muestras de suero, se explotó la capacidad de los anticuerpos ch806 anti-idiotípicos novedosos para unir simultáneamente regiones variables de 806 en el desarrollo de un ELISA sensible, específico para medir ch806 en muestras clínicas (Figura 42). Utilizando LMH-12 para la captura y -LMH-12 Biotinilado para la detección, el ELISA validado demostró curvas de unión altamente reproducibles para medir ch806 (2 µg/ml - 1.6 ng/ml) en suero con un límite de detección de 3 ng/ml. (n=12; 1-100 ng/ml, Coeficiente de Variación < 25%; 100 ng/ml - 5 µg/ml, Coeficiente de Variación < 15%). No resultó evidente una unión de fondo con los tres sueros de donantes sanos sometidos a ensayo y se observó una unión despreciable con hu3S193 de control isotípico. El hibridoma produce elevados niveles de anticuerpo LMH-12, y se planea la producción a gran escala para posibilitar la medición de ch806 la cuantificación de cualquier respuesta inmunitaria en muestras clínicas. (Brown and Ling 1988).

35 *Resultados**Inmunización de ratones y selección de los clones de hibridoma*

40 La inmunorreactividad de las muestras de suero pre- y post-inmunización indicó el desarrollo de mAbs anti-ch806 and anti-huIgG de ratón de elevado título. Inicialmente se seleccionaron veinticinco hibridomas que producen anticuerpos que se unen a ch806, pero no a huIgG. Las características de unión de algunos de estos hibridomas se muestran en la Figura 42A y 42B. Cuatro de estos hibridomas anti-ch806 con alta afinidad de unión (clones 3E3, 5B8, 9D6 y 4D8) se buscaron con posterioridad para la expansión clonal a partir de células individuales mediante dilución limitante y se designaron Ludwig Institute for Cancer Research Melbourne Hybridoma (LMH) -11, -12, -13, y -14, respectivamente (Figura 42).

Actividades de Unión y Bloqueo de Anticuerpos Anti-Idiotípicos Seleccionados

50 La capacidad de los anticuerpo anti-ch806 para unirse simultáneamente a los anticuerpos ch806 es una característica deseable para su uso como reactivos en un ELISA para determinar los niveles de ch806 en suero. Los hibridomas clónicos, LMH-11, -12, -13, y -14 demostraron unión simultánea (datos no mostrados).

55 Después de la expansión clonal, se examinaron los sobrenadantes de cultivo del hibridoma mediante ELISA en busca de la capacidad para neutralizar la actividad de unión al antígeno de ch806 o mAb 806 con sEGFR621. Los resultados demostraron la actividad antagónica de los mAbs anti-idiotípicos LMH-11, -12, -13, y -14 con el bloqueo en solución de la unión tanto de ch806 como de mAb 806 de mÚrido a placas recubiertas con sEGFR (Figura 41 para LMH-11, -12, -13).

60 Después del cultivo a gran escala en botellas giratorias se verificaron las especificidades de unión de los hibridomas clónicos establecidos, LMH-11, -12, -13, and -14 mediante ELISA. Los anticuerpos LMH-11 a -14 se identificaron como el isotipo IgG1κ mediante el kit de isotipificación de anticuerpos monoclonales de ratón.

ch806 en Muestras Clínicas de Suero: Desarrollo del Ensayo ELISA Farmacocinético

65 Para ayudar a la determinación de ch806 en muestras de suero, se explotó la capacidad de los anticuerpos ch806 anti-idiotípicos para unirse simultáneamente a la región variable de 806 en el desarrollo de un ensayo ELISA sensible y específico en busca de ch806 en muestras clínicas. Los tres clones purificados LMH-11, -12, y -13 (Figura 49, B, and C respectivamente) se compararon en busca de su capacidad para capturar y después detectar la unión a ch806

ES 2 334 494 T3

en los sueros. Los resultados indicados utilizando LMH-12 (10 $\mu\text{g/ml}$) para la captura y LMH-12 biotinilado para la detección produjeron la sensibilidad más alta para ch806 en suero (3 ng/ml) con una unión de fondo despreciable.

5 Habiendo establecido las condiciones de ELISA farmacocinéticas óptimas utilizando 1 $\mu\text{g/ml}$ de LMH-12 anti-idiotípico y 1 $\mu\text{g/ml}$ de LMH-12 biotinilado para la captura y la detección, respectivamente, se realizó la validación del método. Se realizaron tres ELISA separados por cuadruplicado para medir ch806 en suero de donante de tres donantes sanos o BSA/medios al 1% con el control isotópico hu3S193. Los resultados de la validación se presentan en la Figura 43 y demuestran curvas de unión altamente reproducibles para medir ch806 (2 $\mu\text{g/ml}$ - 1,6 ng/ml) en sueros con un límite de detección de 3 ng/ml. (n=12; 1-100 ng/ml, Coeficiente de Variación < 25%; 100 ng/ml- 5
10 $\mu\text{g/ml}$, Coeficiente de Variación < 15%). No resultó evidente unión de fondo con ninguno de los tres sueros sometidos a ensayo y no se observó una unión despreciable con hu3S193 de control isotópico.

Referencias

15 En realidad éstas se deben incorporar a las del final del Ejemplo 17 y poner al final de todos los ejemplos

Brown, G. and N. Ling (1988). Murine Monoclonal Antibodies. Antibodies, Volume 1. A Practical Approach. D. Catty. Oxford, England, *IRL Press*: 81-104.

20 **Bhattacharya-Chatterjee, M., S. K. Chatterjee, et al. (2001).** "The anti-idiotypic vaccines for immunotherapy". *Curr Opin Mol Ther* 3(1): 63-9.

25 **Domagala, T., N. Konstantopoulos, et al. (2000).** "Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between epidermal growth factor (EGF) and the extracellular domain of the EGF receptor". *Growth Factors* 18(1): 11-29.

30 **Safa, M. M. and K. A. Foon (2001).** "Adjuvant immunotherapy for melanoma and colorectal cancers". *Semin Oncol* 28(1): 68-92.

Uemura, Ii, E. Okajima, et al. (1994). "Internal image anti-idiotypic antibodies related to renal-cell carcinoma-associated antigen G250". *Int J Cancer* 56(4): 609-14.

Ejemplo 23

Evaluación de las estructuras carbohidratadas y reconocimiento de anticuerpos

40 Los experimentos se emprendieron para evaluar adicionalmente el papel de las estructuras carbohidratadas en la unión y el reconocimiento del EGFR, tanto amplificado como de2-7 EGFR, por el anticuerpo mAb806.

Para determinar si las estructuras carbohidratadas están implicadas directamente en el epítipo mAb 806, el sEGFR recombinante expresado en células CHO se trató con PNGasa F para eliminar la glicosilación ligada a N. Después del tratamiento, la proteína se hizo correr en SDS-PAGE, se transfirió a una membrana y se inmunotransfirió con mAb 806 (Figura 44). Como se esperaba, el sEGFR desglicosilado corre más rápido en la SDS-PAGE, indicando que los carbohidratos han sido eliminados satisfactoriamente. El anticuerpo mAb 806 se une claramente a la sustancia desglicosilada demostrando que el epítipo del anticuerpo es un péptido en la naturaleza y no sólo un epítipo de glicosilación.

50 Los productos lisados, preparados a partir de líneas celulares marcadas metabólicamente con S^{35} , se inmunoprecipitaron con diferentes anticuerpos dirigidos al EGFR (Figura 45). Como se esperaba, el anticuerpo 528 inmunoprecipitó 3 bandas a partir de células U87MG. Δ 2-7, una banda superior correspondiente al EGFR de tipo salvaje (wt) y dos bandas inferiores correspondientes al de2-7 EGFR. Estas dos bandas de de2-7 EGFR han sido referidas previamente y se supone que representan glicosilación diferencial (Chu *et al.* (1997) *Biochem. J.* Jun 15;324 (Pt 3):885-861). En contraste, mAb 806 sólo inmunoprecipitó las dos bandas de de2-7 EGFR, estando el receptor wt completamente ausente incluso después de la exposición en exceso (datos no mostrados). Interesantemente, mAb806 mostró un aumento de reactividad relativa con la banda de de2-7 EGFR inferior pero un descenso de reactividad con la banda superior cuando se comparó con el anticuerpo 528. El anticuerpo SC-03, un anticuerpo policlonal de conejo comercial dirigido al dominio C-terminal del EGFR, inmunoprecipitó las tres bandas de EGFR como se observa con el anticuerpo 528 aunque
60 la cantidad total de receptor inmunoprecipitado por este anticuerpo fue considerablemente menor. No se observaron bandas cuando se utilizó un anticuerpo IgG2b irrelevante como control para el mAb 806.

El anticuerpo 528 inmunoprecipitó una sola banda a partir de las células U87MG.wtEGFR correspondientes al receptor wt (Figura 45). El mAb 806 también inmunoprecipitó una sola banda a partir de estas células, no obstante, esta banda de EGFR migró claramente más rápido que el receptor reactivo 528. El anticuerpo SC-03 inmunoprecipitó ambas bandas reactivas de EGFR a partir de las células U87MG.wtEGFR, confirmando adicionalmente que el mAb 806 y 528 reconocen diferentes formas de EGFR en productos lisados de células completas de estas células.

ES 2 334 494 T3

Según se observó con las células U87MG.wtEGFR, el anticuerpo 528 inmunoprecipitó una sola banda de EGFR a partir de las células A431 (Figura 45). La banda de EGFR reactivo 528 es muy ancha sobre estos geles de bajo porcentaje (6%) y probablemente refleja la diversidad de glicosilación del receptor. También se observó una sola banda de EGFR después de la inmunoprecipitación con mAb 806. Si bien esta banda de EGFR no migra considerablemente más rápido que la banda reactiva ancha total de 528, ésta se localizó en el borde delantero de la banda 528 ancha de una manera reproducible. A diferencia de los productos lisados celulares de U87MG.Δ2-7, la cantidad total de EGFR inmunoprecipitado por mAb 806 a partir de productos lisados de A431 fue considerablemente menor que con el anticuerpo 528, un resultado coherente con los datos de Scatchard de los autores de la presente invención que muestran que mAb 806 sólo reconoce una porción del EGFR sobre la superficie de estas células (véase el Ejemplo 4 anterior). La inmunoprecipitación con SC-03 dio como resultado una sola banda de EGFR ancha como para el anticuerpo 528. Se obtuvieron resultados similares con las células HN5 (datos no mostrados). Tomados juntos, estos datos indican que mAb 806 reacciona preferentemente con especies que migran más rápidamente del EGFR, lo que puede representar formar glicosiladas diferentemente del receptor.

Con el fin de determinar en que fase de procesamiento del receptor aparecía reactividad con mAb 806 se efectuó un experimento de pulso/caza. Las células A431 y U87MG.Δ2-7 se pulsaron durante 5 min con metionina/cisteína 35S, después se incubaron a 37°C varias veces antes de la inmunoprecipitación con mAb 806 o 528 (Figura 46). El patrón de inmunoprecipitación en las células A431 con el anticuerpo 528 fue típico de un anticuerpo de conformación dependiente del EGFR. Una pequeña cantidad de receptor se inmunoprecipitó a los 0 min (esto es después de un pulso de 5 min) aumentando la cantidad de EGFR marcado en cada momento. También hubo un aumento simultáneo del peso molecular del receptor con el tiempo. En contraste, el material de EGFR reactivo con mAb 806 estuvo presente a altos niveles a los 0 min, con un máximo a los 20 min y después se redujo en cada momento adicional. De este modo, parece que mAb 806 reconoce preferentemente una forma del EGFR encontrada en la primera fase del procesamiento.

La reactividad del anticuerpo observada en las células U87MG.Δ2-7 marcadas con el pulso fue más complicada. La inmunoprecipitación con el anticuerpo 528 a los 0 min reveló que una pequeña cantidad de la banda de de2-7 EGFR inferior estaba marcada (Figura 46). La cantidad de la banda inferior de de2-7 EGFR reactivo con 528 aumentó con el tiempo, con un máximo a los 60 min y declinando lentamente a las 2 y las 4 h. No se detectó una cantidad significativa de la banda superior marcada de de2-7 EGFR hasta los 60 min, después de lo cual el nivel continuó aumentando hasta el final del transcurso del tiempo. Esto indica claramente que el de2-7 EGFR superior es una forma más madura de receptor. La reactividad con mAb 806 también varió durante el estudio del curso del tiempo, no obstante el mAb 806 precipitó preferentemente la banda más baja del de2-7 EGFR. Por supuesto, no hubo niveles significativos de la banda superior de mAb 806 observados hasta las 4 h del marcaje.

Los experimentos anteriores sugieren que el mAb 806 reacciona preferentemente con una forma de glicosilación más inmadura de de2-7 y wt EGFR. Esta posibilidad se sometió a ensayo inmunoprecipitando el EGFR de diferentes líneas celulares marcadas durante la noche con metionina/cisteína 35S y sometiendo después los precipitados resultantes a digestión con Endoglucosidasa H (Endo H). Esta enzima separa preferentemente carbohidratos de los del tipo con alto contenido de manosa (esto es, glicosilación inmadura) de las proteínas dejando intactos los carbohidratos complejos (esto es, glicosilación madura). La inmunoprecipitación y digestión con Endo H de productos lisados de células U87MG.Δ2-7 con 528, mAb 806 y SC-03 produjeron resultados similares (Figura 47). Como se pronosticó, la banda inferior de de2-7 EGFR fue completamente sensible a la digestión con Endo H, migrando más rápidamente en la SDS-PAGE después de la digestión con Endo H, demostrando que esta banda representa la forma con alto contenido de manosa del de2-7 EGFR. La banda de de2-7 EGFR superior fue esencialmente resistente a la digestión con Endo H, mostrando sólo una diferencia muy ligera en la migración tras la digestión con Endo H, indicando que la mayoría de las estructuras carbohidratadas son de tipo complejo. El descenso complejo pero reproducible del peso molecular de la banda superior después de la digestión enzimática sugiere que mientras que los carbohidratos de la banda de de2-7 EGFR superior son predominantemente de tipo complejo, ésta posee algo de estructural con alto contenido de manosa. Interesantemente, estas células también expresan bajas cantidades de wt EGFR endógeno que es claramente visible después de la inmunoprecipitación con 528. También hubo una pequeña pero notable reducción del peso molecular del receptor wt después de la digestión con Endo H, indicando que también contiene estructuras con alto contenido de manosa.

La sensibilidad del wt EGFR inmunoprecipitado a la digestión con Endo H fue similar tanto en células U87MG.wtEGFR como A431 (Figura 47). El grueso del material precipitado por el anticuerpo 528 fue resistente a la enzima Endo H aunque una pequeña cantidad de material fue de la forma con alto contenido de manosa. De nuevo hubo un pequeño descenso del peso molecular del wt EGFR después de la digestión con Endo H sugiriendo que contiene algo de estructuras con alto contenido de manosa. Los resultados utilizando el anticuerpo SC-03 fueron similares a los del anticuerpo 528. En contraste, la mayoría del EGFR precipitado con mAb 806 fue sensible a Endo H tanto en células U87MG.wtEGFR como A431, confirmando que mAb 806 reconoce preferentemente la forma con alto contenido de manosa del EGFR. Se obtuvieron resultados similares con las células HN-5, donde la mayoría del material precipitado con mAb 806 fue sensible a la digestión con Endo H, mientras que la mayoría del material precipitado con mAb528 y SC-03 fue resistente a la digestión con Endo H (datos no mostrados).

La yodación de la superficie celular de la línea celular A431, se realizó con I¹²⁵ seguido de inmunoprecipitación con el anticuerpo 806. El protocolo para la yodación de la superficie fue el siguiente: La lisis celular, la inmunoprecipitación, la digestión con Endo H, la SDS PAGE y la autorradiografía son las descritas aquí anteriormente. Para el marcaje, las células se hicieron crecer en medios con FCS al 10%, se separaron con EDTA, se lavaron dos veces

ES 2 334 494 T3

con PBS, después se resuspendieron en 400 μ l de PBS (aprox $2-3 \times 10^6$ células). A esto se le añadieron 15 μ l de I^{125} (provisión de partida de 100 mCi/ml), provisión de partida de 100 μ l de lactoperoxidasa bovina (1 mg/ml), 10 μ l de H_2O_2 (provisión de partida al 0,1%) y esto se incubó durante 5 min. Después se añadieron 10 μ l adicionales de H_2O_2 y la incubación continuó durante 3 min adicionales. Las células se lavaron después de nuevo 3 veces con PBS y se lisaron en Triton al 1%. La yodación de la superficie celular de la línea celular A431 con lactoperoxidasa, seguido de inmunoprecipitación con el anticuerpo 806, mostró que, de una manera similar a los productos lisados de células completas descritos antes, la forma predominante del EGFR reconocida por 806 unida a la superficie celular de las células A431 fue sensible a la digestión con EndoH (Figura 48). Esto confirma que la forma de EGFR unida mediante 806 sobre la superficie de celular de la células A431 en una forma sensible a EndoH y por tanto es del tipo con alto contenido de manosa.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo aislado o uno de sus fragmentos activos que reconoce un epítipo de EGFR que se encuentra en células tumorigénicas o hiperproliferativas o células que expresan en exceso EGFR o expresan un EGFR mutante, donde dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos activos (i) se une a EGFR de tipo salvaje humano unido a la célula sólo cuando el EGFR es amplificado o expresado en exceso; (ii) se une a EGFR de2-7 en un epítipo distinto del péptido de empalme LEEKKONYVVTDH y (iii) se une a un epítipo en la secuencia de los restos 273-501 del EGFR humano de tipo salvaje.
- 10 2. Un anticuerpo aislado o uno de sus fragmentos activos de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos activos comprende un polipéptido que se une al dominio que comprende una secuencia de aminoácidos presentada como los restos 115-123 del SEQ ID NO:2 o dicha secuencia de aminoácidos que contiene una o dos sustituciones en la misma.
- 15 3. El anticuerpo o uno de sus fragmentos activos de la reivindicación 2, donde el dominio de unión al polipéptido comprende adicionalmente una secuencia de aminoácidos presentada como una o ambas de las secuencias de los restos 44-54 y 68-83 del SEQ ID NO: 2, o una o ambas de dichas secuencias de los restos que contienen una o dos sustituciones en las mismas.
- 20 4. Un anticuerpo aislado o uno de sus fragmentos activos de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos activos comprende un dominio de unión al polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos presentada como los restos 109-117 del SEQ ID NO:4 o dicha secuencia de aminoácidos que contiene una o dos sustituciones en la misma.
- 25 5. El anticuerpo o uno de sus fragmentos activos de la reivindicación 2 o 3, que comprende adicionalmente un segundo dominio de unión al polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos presentada como los restos 109-117 del SEQ ID NO:4, o dicha secuencia de aminoácidos que contiene una o dos sustituciones en la misma.
- 30 6. El anticuerpo o uno de sus fragmentos activos de la reivindicación 4, donde el dominio de unión al polipéptido comprende adicionalmente una secuencia de aminoácidos presentada como una o ambas de las secuencias de los restos 44-54 y 70-76 del SEQ ID NO: 4, o una o ambas de dichas secuencias de los restos que contienen una o dos sustituciones en las mismas.
- 35 7. El anticuerpo o uno de sus fragmentos activos de la reivindicación 5 donde el segundo dominio de unión al polipéptido comprende adicionalmente una secuencia de aminoácidos presentada como una o ambas de las secuencias de los restos 44-54 y 70-76 del SEQ ID NO:4, o una o ambas de dichas secuencias de los restos que contienen una o dos sustituciones en las mismas.
- 40 8. El anticuerpo o uno de sus fragmentos activos de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, donde dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos activos comprende la secuencia de polipéptidos expuesta en uno o ambos del SEQ ID NO:2 y el SEQ ID NO:4.
- 45 9. El anticuerpo o uno de sus fragmentos activos de la reivindicación 8, donde la secuencia de polipéptidos es expuesta en el SEQ ID NO:2.
- 50 10. El anticuerpo o uno de sus fragmentos activos de la reivindicación 8, donde la secuencia de polipéptidos es expuesta en el SEQ ID NO:4.
- 55 11. Un anticuerpo aislado o uno de sus fragmentos activos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el anticuerpo es completamente humano, humanizado o quimerizado.
- 60 12. El anticuerpo aislado o uno de sus fragmentos activos de acuerdo con la reivindicación 11, donde los dominios de unión al anticuerpo son portados por un marco de anticuerpo humano.
- 65 13. El anticuerpo aislado o uno de sus fragmentos activos de acuerdo con la reivindicación 12, donde dicho marco de anticuerpo humano es un marco de anticuerpo IgG1 humano.
14. Un anticuerpo aislado o uno de sus fragmentos activos de acuerdo con la reivindicación 12, que es un anticuerpo quimérico o uno de sus fragmentos activos, donde dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos activos comprenden una cadena pesada y una cadena ligera donde la cadena pesada comprende los dominios de unión al anticuerpo presentados como el SEQ ID NO:2 y una región constante de la cadena pesada de IgG1 humana.
15. Un anticuerpo aislado o uno de sus fragmentos activos de acuerdo con la reivindicación 12, que es un anticuerpo quimérico o uno de sus fragmentos activos, donde dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos activos comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena ligera comprende los dominios de unión al anticuerpo presentados como el SEQ ID NO:4 y una región constante de la cadena ligera kappa humana.

ES 2 334 494 T3

16. Un anticuerpo aislado o uno de sus fragmentos activos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 en forma de un anticuerpo F(ab')₂, un fragmento scFv, un fragmento biespecífico, un fragmento trispecífico o un fragmento tetraespecífico.

5 17. Un anticuerpo aislado o uno de sus fragmentos activos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que porta una marca detectable o funcional.

18. Un anticuerpo aislado o uno de sus fragmentos activos de acuerdo con la reivindicación 17, donde dicha marca es un fármaco unido covalentemente o una radiomarca.

10 19. El anticuerpo aislado o uno de sus fragmentos activos de acuerdo con la reivindicación 18, donde dicha radiomarca es una cualquiera de H³, C¹⁴, P³², S³⁵, Cl³⁶, Cr⁵¹, Co⁵⁷, Co⁵⁸, Fe⁵⁹, Y⁹⁰, I¹²¹, I¹²⁴, I¹²⁵, I¹³¹, In¹¹¹, At²¹¹, Au¹⁹⁸, Cu⁶⁷, Ac²²⁵, Bi²¹³, Tc⁹⁹ o Re¹⁸⁶.

15 20. Un anticuerpo aislado o uno de sus fragmentos activos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que está pegilado.

21. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un anticuerpo o uno de sus fragmentos activos como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

20 22. Un método para preparar un anticuerpo o uno de sus fragmentos activos como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, que comprende expresar el ácido nucleico de la reivindicación 21 en condiciones para ocasionar la expresión de dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos activos, y recuperar el anticuerpo o uno de sus fragmentos activos.

25 23. Un anticuerpo o uno de sus fragmentos activos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, para su uso en un método de tratamiento o diagnóstico del cuerpo humano o animal.

30 24. El uso de un anticuerpo o uno de sus fragmentos activos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención del cáncer en un mamífero.

25. El uso de acuerdo con la reivindicación 24, donde dicho cáncer está localizado en o es adyacente al cerebro.

35 26. El uso de acuerdo con la reivindicación 25, donde dicho cáncer es un cáncer residente en el cerebro seleccionado entre un glioblastoma, meduloblastoma, meningioma, astrocitoma neoplásico y malformación arteriovenosa neoplásica.

27. El uso de acuerdo con la reivindicación 24, donde dicho cáncer es un tumor neural.

40 28. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, donde dicho anticuerpo o uno de sus fragmentos activos se administra sistémicamente.

45 29. Un kit para la diagnosis de un tumor en el que el EGFR es amplificado o expresado en exceso o el EGFR es expresado en forma de una proteína truncada, comprendiendo dicho kit un anticuerpo o uno de sus fragmentos activos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, opcionalmente con reactivos y/o instrucciones para su uso.

50 30. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o uno de sus fragmentos activos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, y opcionalmente, un vehículo, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

55 31. Un kit para el tratamiento de un tumor en un paciente humano, que comprende una forma de dosificación farmacéutica de la composición farmacéutica de la reivindicación 30, y una forma de dosificación farmacéutica separada que comprende un agente anticanceroso adicional seleccionado del grupo que consiste en agentes quimioterapéuticos, anticuerpos anti-EGFR, agentes radioinmunoterapéuticos, y sus combinaciones.

60 32. El kit de la reivindicación 31, donde dichos agentes quimioterapéuticos se seleccionan del grupo que consiste en inhibidores de tirosina quinasa, inhibidores de la cascada de fosforilación, moduladores post-traduccionales, inhibidores del crecimiento o la división celulares (p. ej. anti-mitóticos), inhibidores de la transducción de la señal, y sus combinaciones.

33. El kit de la reivindicación 32, donde dichos inhibidores de la tirosina quinasa se seleccionan del grupo que consiste en AG1478, ZD1839, ST1571, OSI-774, SU-6668, y sus combinaciones.

65 34. El kit de la reivindicación 31, donde dichos anticuerpos anti-EGFR se seleccionan del grupo que consiste en los anticuerpos anti-EGFR 528, 225, SC-03, D8.3, L8A4, Y10, ICR62, ABX-EGF, y sus combinaciones.

ES 2 334 494 T3

35. Un anfitrión unicelular transformado con una molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN o una de sus variantes degeneradas, que codifica el anticuerpo o uno de sus fragmentos activos de una cualquiera de las reivindicaciones 1-20, seleccionado del grupo que consiste en

- 5 (A) la secuencia de ADN del SEQ ID NO:1;
- (B) la secuencia de ADN del SEQ ID NO:3;
- 10 (C) la secuencia de ADN del SEQ ID NO:1, y la secuencia de ADN del SEQ ID NO:3;
- (D) la secuencia de ADN del SEQ ID NO:1, con una secuencia de IgG1 constante expuesta en el SEQ ID NO:8 y la secuencia de ADN del SEQ ID NO:3, con una secuencia kappa constante expuesta in SEQ ID NO.7;
- 15 (E) las secuencias de ADN que hibridan con cualquiera de las secuencias de ADN anteriores en condiciones de hibridación convencionales; y
- (F) las secuencias de ADN que codifican la expresión de una secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de las secuencias de ADN anteriores;

20 donde dicha secuencia de ADN se une operativamente a una secuencia de control de la expresión.

36. El anfitrión unicelular de la reivindicación 35, donde el anfitrión unicelular se selecciona del grupo que consiste en *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, levaduras, células CHO, YB/20, NSO, SP2/0, R1.1, B-W, L-M, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40, y BMT10, células vegetales, células de insecto, y células humanas en cultivo de tejidos.

25 37. Un método para detectar la presencia de EGFR o de2-7EGFR amplificado o expresado en exceso donde dicho EGFR se mide:

30 A. poniendo en contacto una muestra biológica de un mamífero en el que se sospecha de la presencia de EGFR o de2-7EGFR amplificado o expresado en exceso con un anticuerpo como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 en condiciones que permiten que se produzca la unión de dicho EGFR a dicho anticuerpo; y

35 B. detectando si se ha producido la unión entre dicho EGFR de dicha muestra y el anticuerpo;

donde la detección de la unión indica la presencia de dicho EGFR en dicha muestra.

38. Un método para detectar el cáncer en mamíferos que comprende detectar la presencia de un EGFR de acuerdo con el método de la reivindicación 37, donde la detección de la presencia del EGFR indica la existencia de un tumor o cáncer en dicho mamífero.

39. El uso del anticuerpo o uno de sus fragmentos activos de la reivindicación 17 para la fabricación de un medicamento para su uso en la formación de imágenes para diagnóstico.

45 40. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, donde el procedimiento para el tratamiento comprende radioinmunoterapia.

50 41. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, donde se administra primero el anticuerpo o uno de sus fragmentos activos, y después de eso se administra una composición que comprende un agente quimioterapéutico.

55

60

65

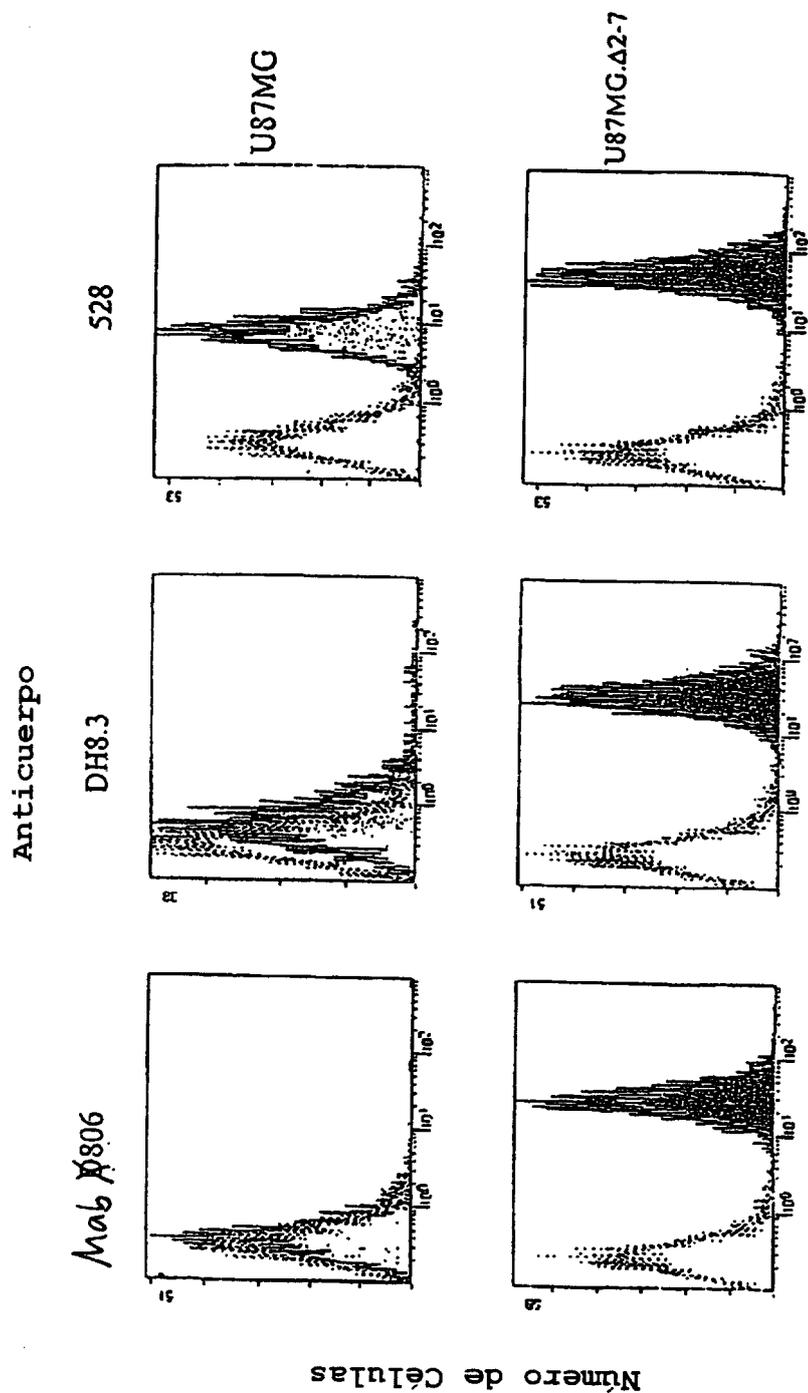
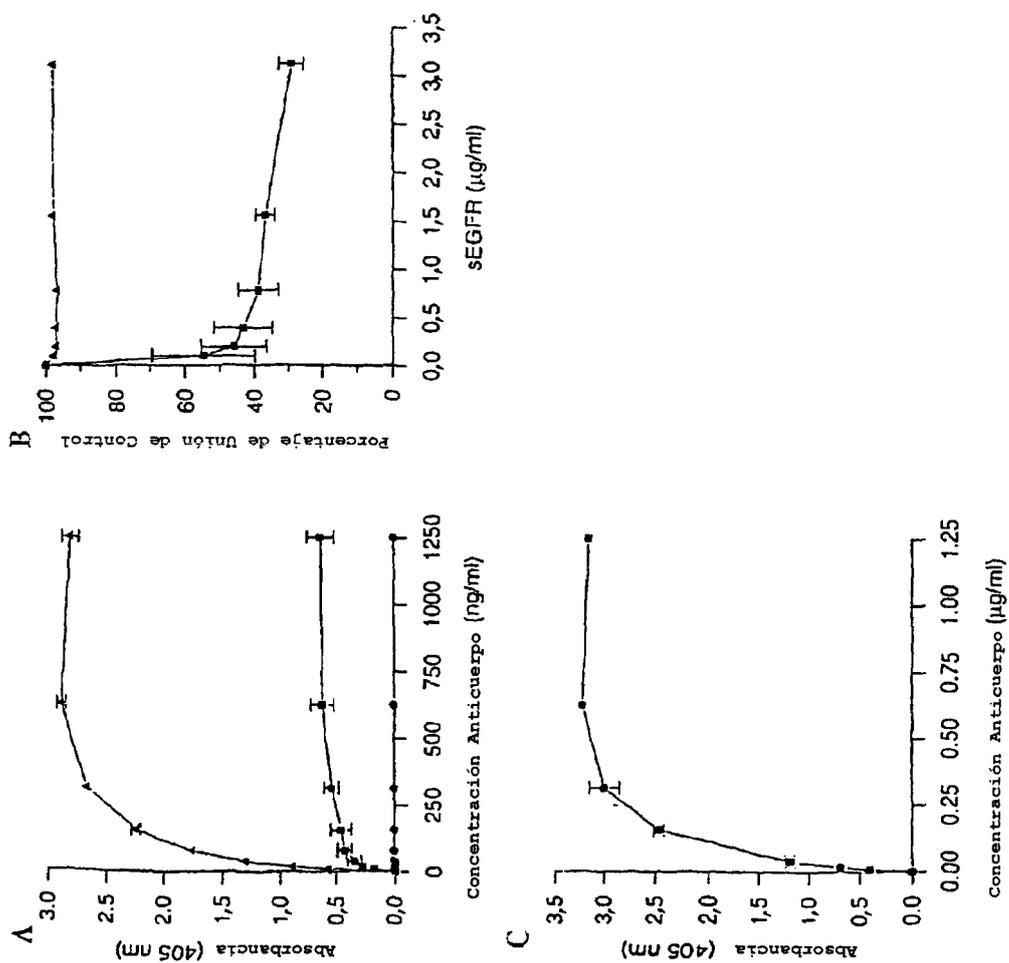


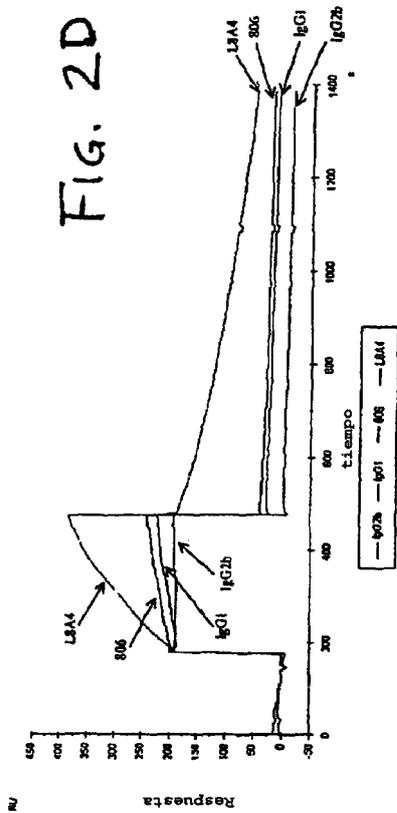
Fig. 1

Intensidad de Fluorescencia

Fig. 2



Reactividad de los Mab a 625 nM con el Péptido C



Reactividad de los Mab a 100 nM con el Péptido C

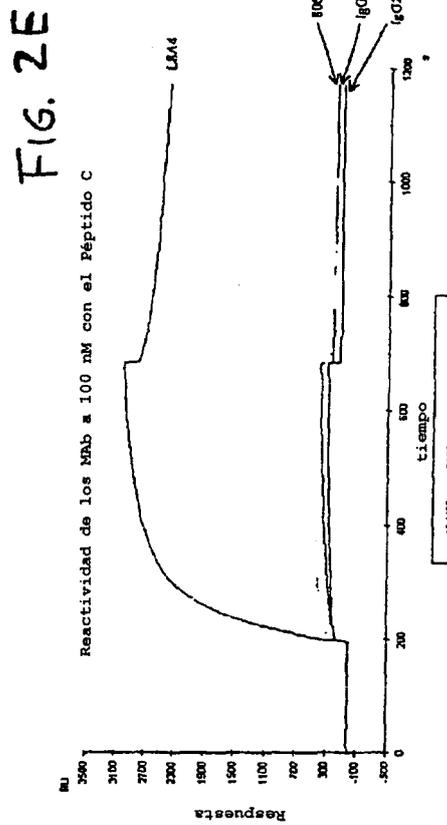
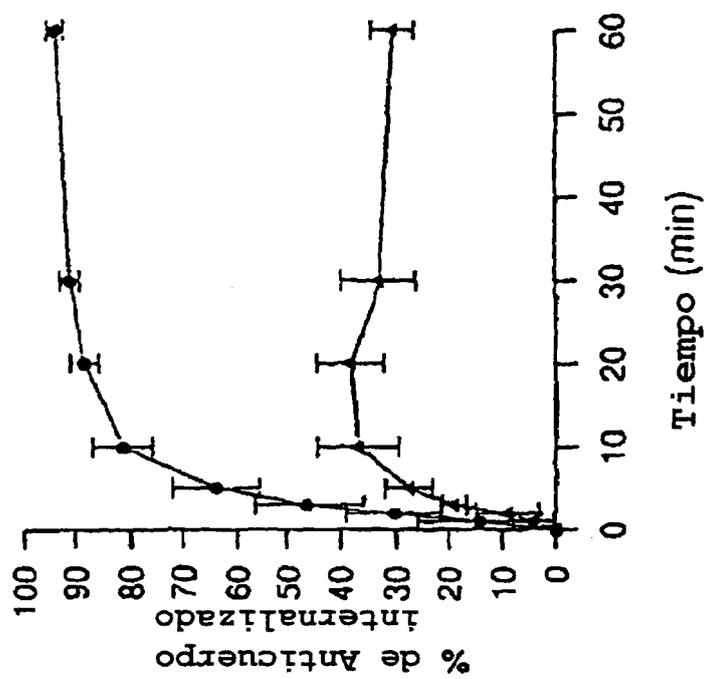


Fig. 3



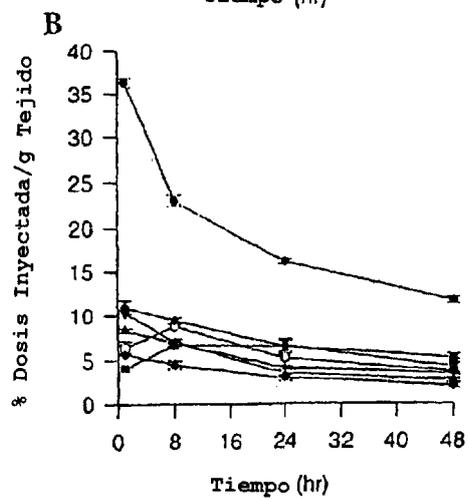
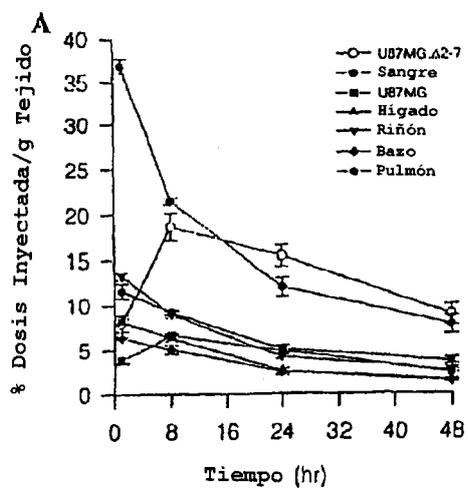


Fig. 4

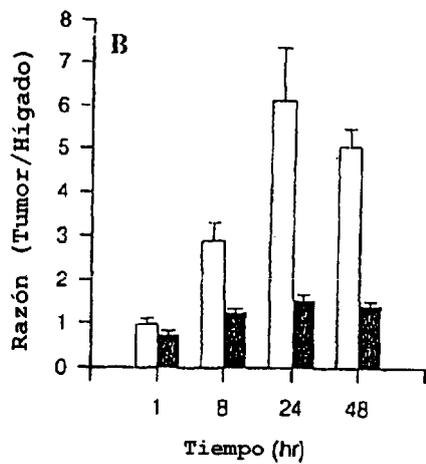
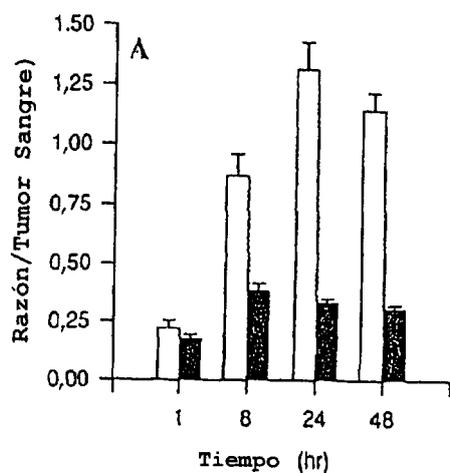


Fig. 5

Fig. 6

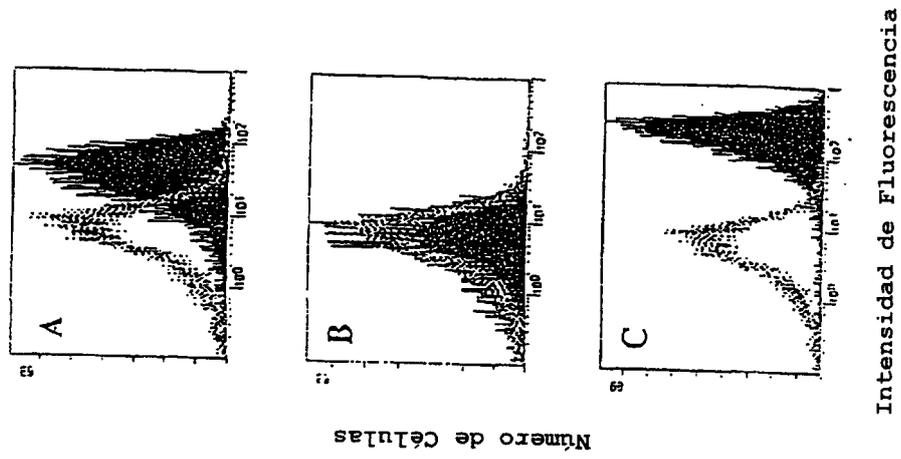


Fig. 7

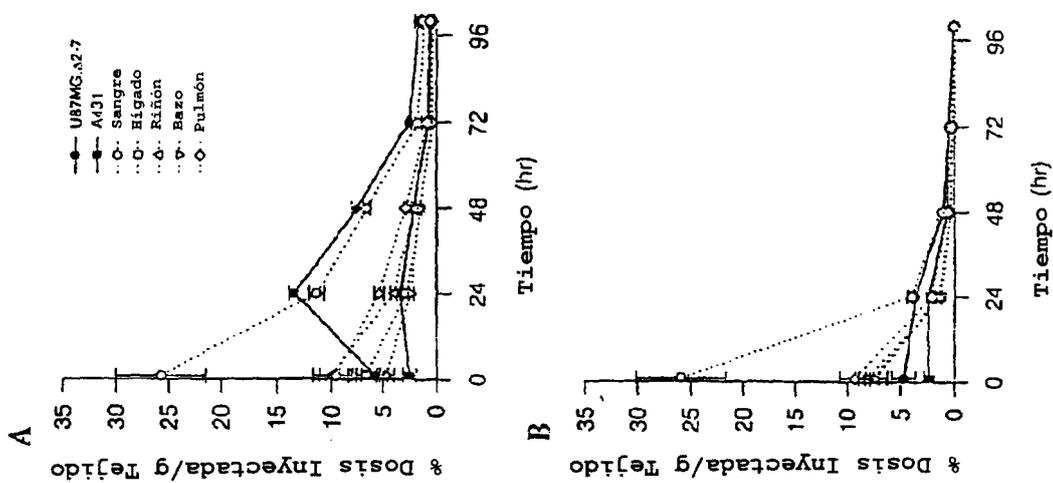


Fig. 8

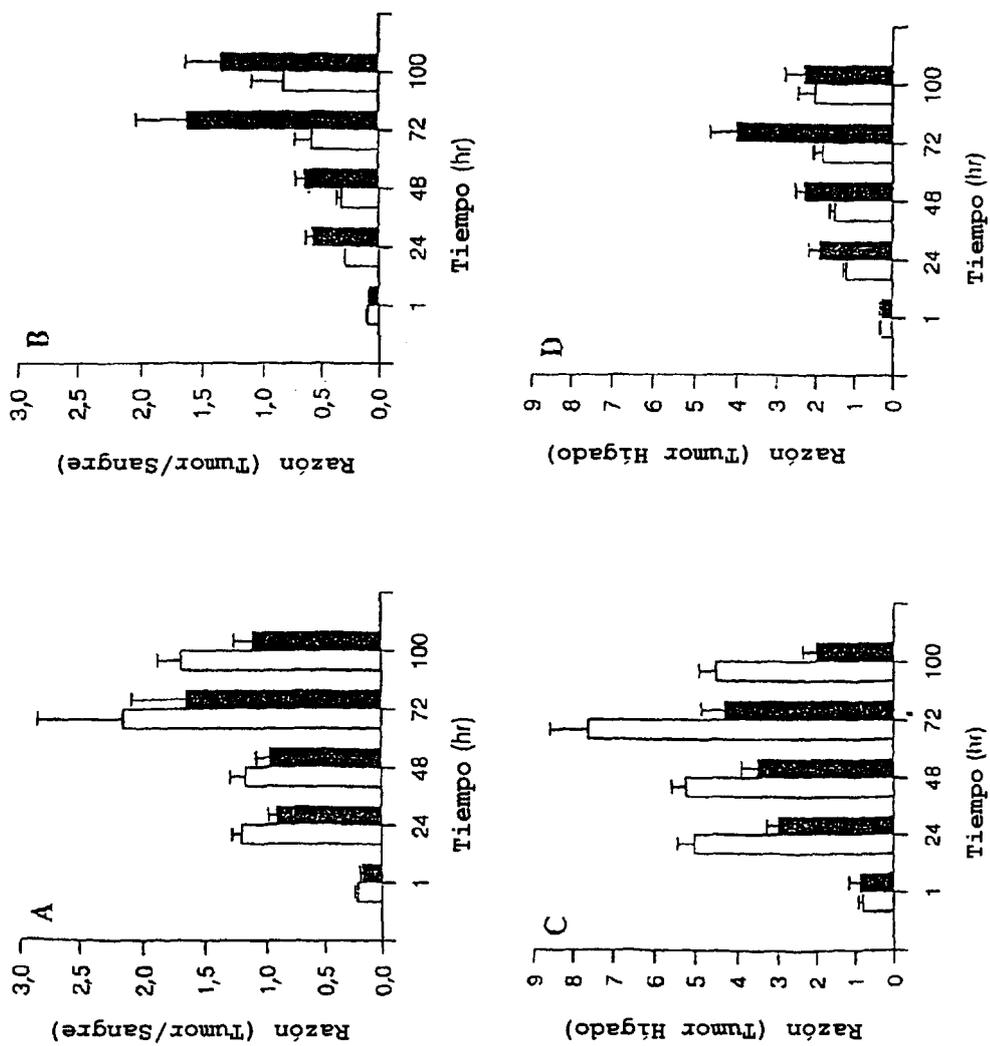


Fig. 9

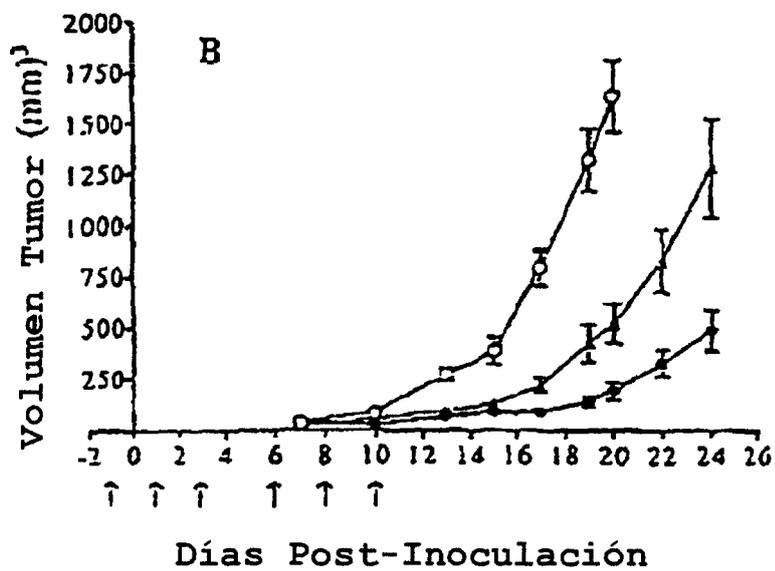
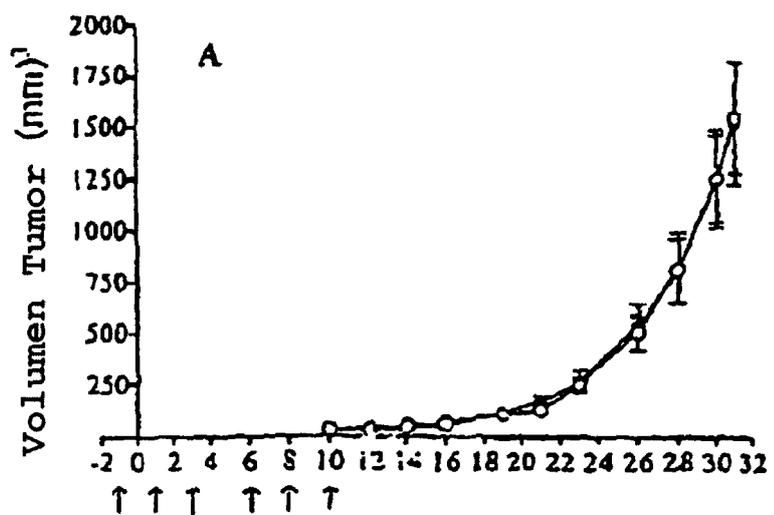


Fig. 10

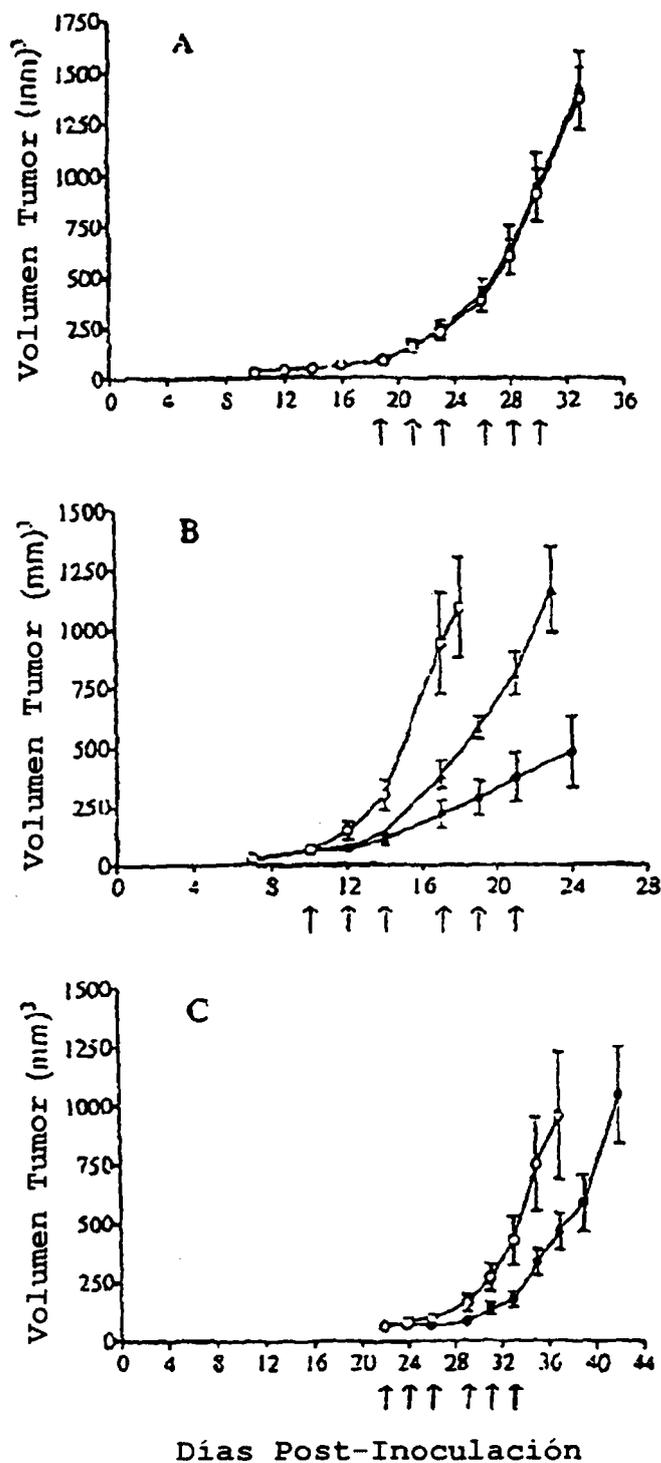
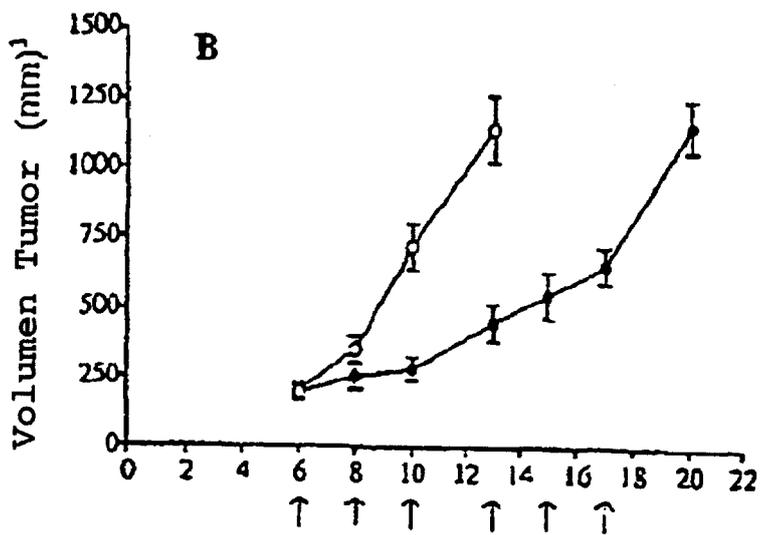
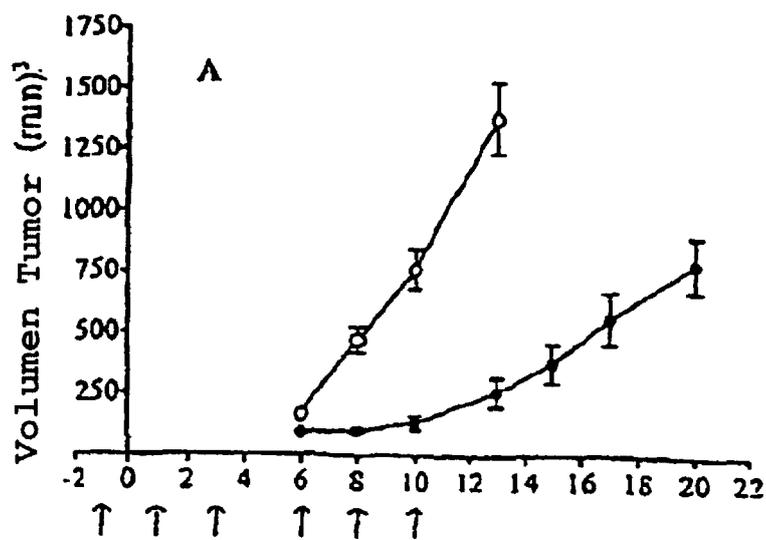


Fig. 11



Días Post-Inoculación

Fig. 12

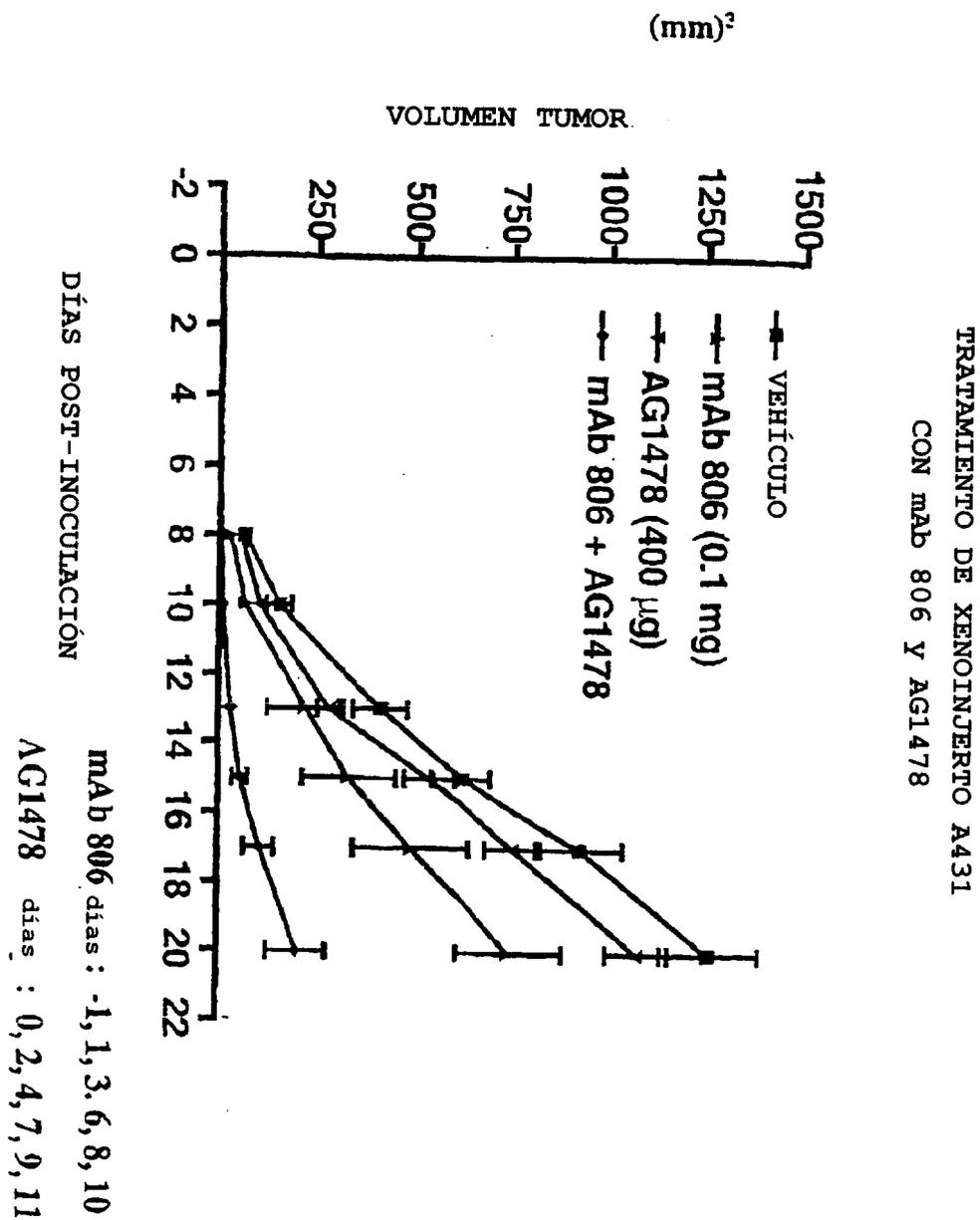


Fig. 13

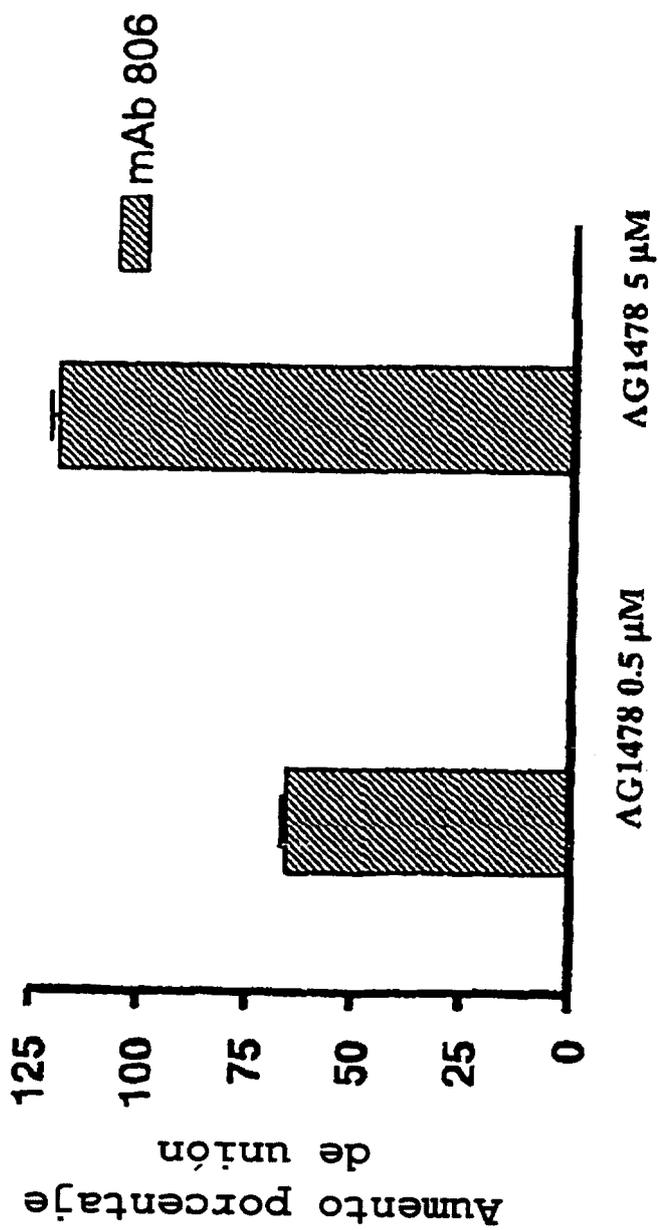


Fig. 14

Secuencia de ADN y Proteínas de VH de 806 y Péptido Señal

A. Secuencia ADN

ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTGGCTGTTACAGCCTTTCCTGGTGTCTGTCT
GATGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTAGCCTGGTGAACCTTCTCAGTCTCT
GTCCCTCACCTGCACTGTCACTGGCTACTCAATCACCAGTGATTTTGCCTGGA
ACTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAAGCTGGAGTGGATGGGCTACATAAG
TTATAGTGGTAACTAGGTACAACCCATCTCTCAAAGTCGAATCTCTATCA
CTCGAGACACATCCAAGAACCAATTCTTCTGCAAGTTGAATTCTGTGACTATT
GAGGACACAGCCACATATTACTGTGTAACGGCGGGACGCGGGTTTCCTTATT
GGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

El área resaltada en azul es el péptido señal.

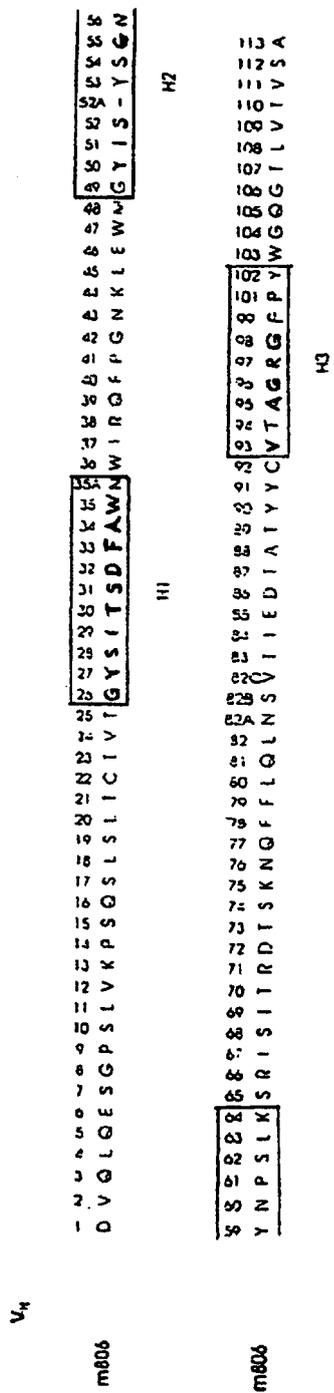
La secuencia restante es la región VH de 806.

B. Secuencia de Proteínas

MRVLILLWLFTA FPGVLSDVQLQESGPSLVKPSQSLSLTC
TVTGYSITSDFAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGNTRYN
PSLKSRI SITRDTSKNQFFLQLNSVTIEDTATYYCVTAGRG
FPYWQQGTLVTVSA

└─┬─> VH

Fig. 16



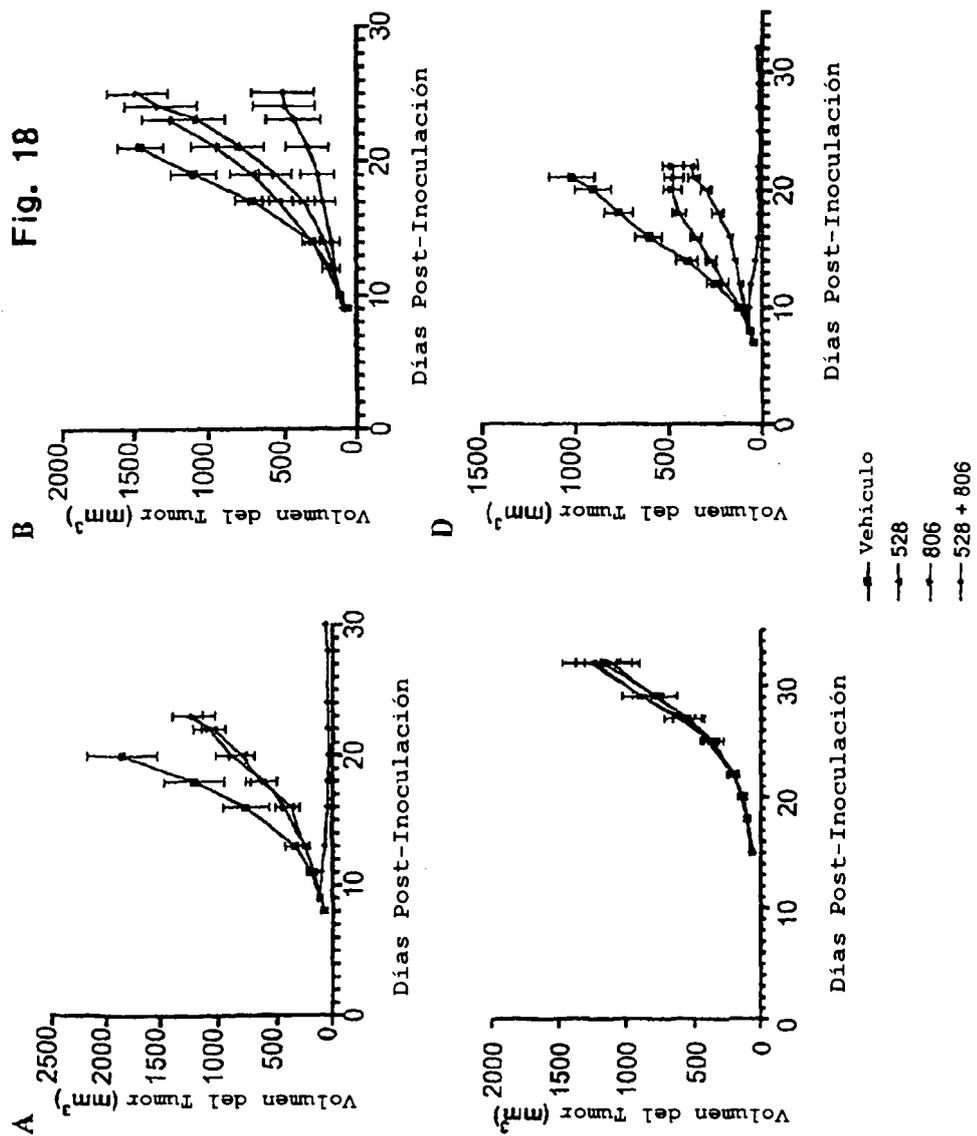


Fig. 19

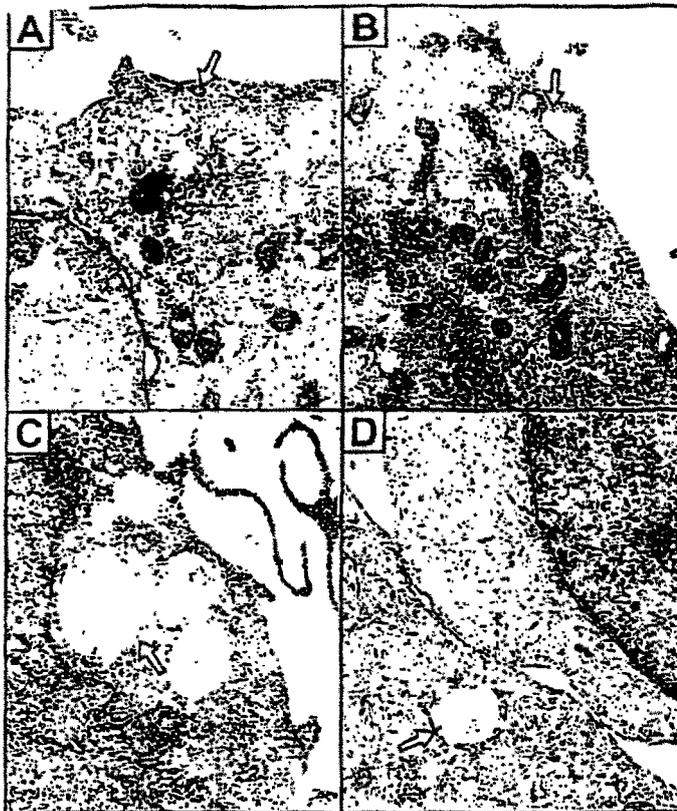


Fig. 20

C



Tinción H y E



autorradiografía

Fig. 21

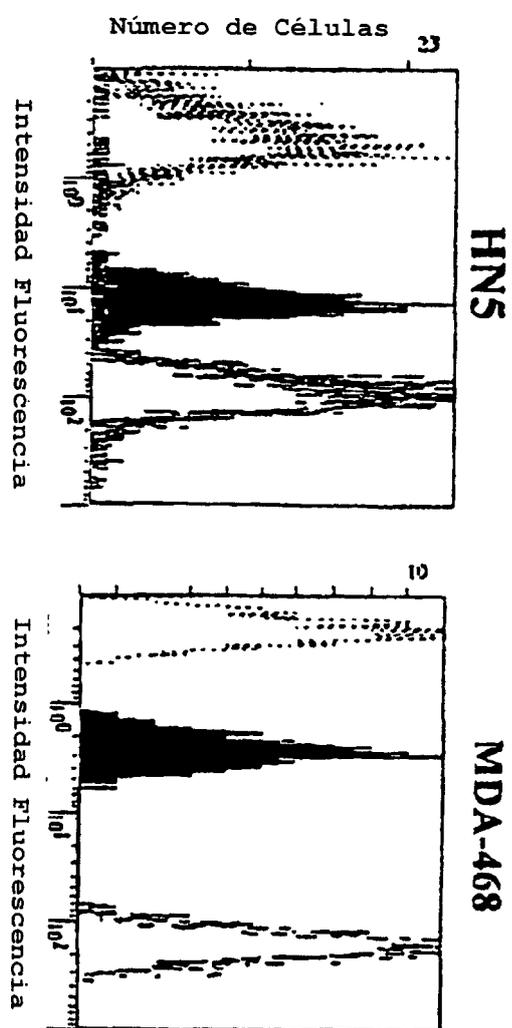


Fig. 22

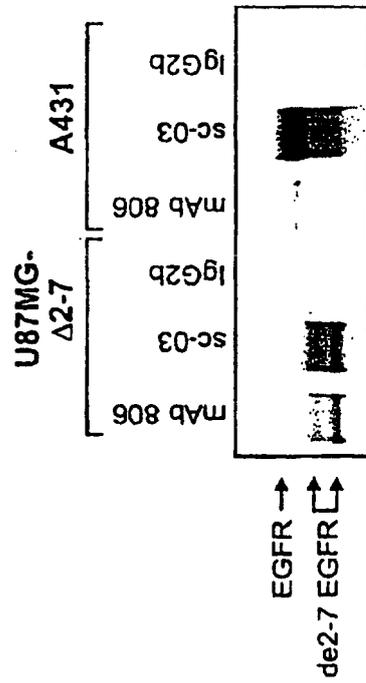


Fig. 23

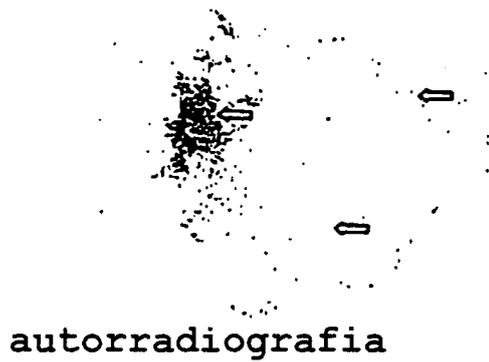
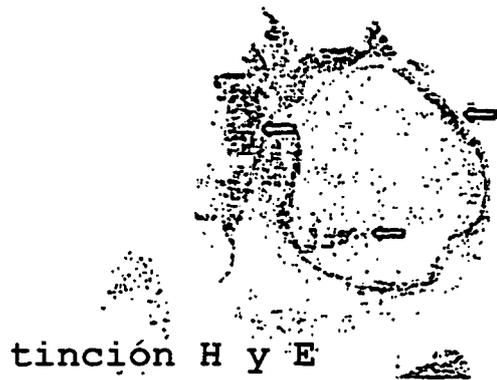


Fig. 24

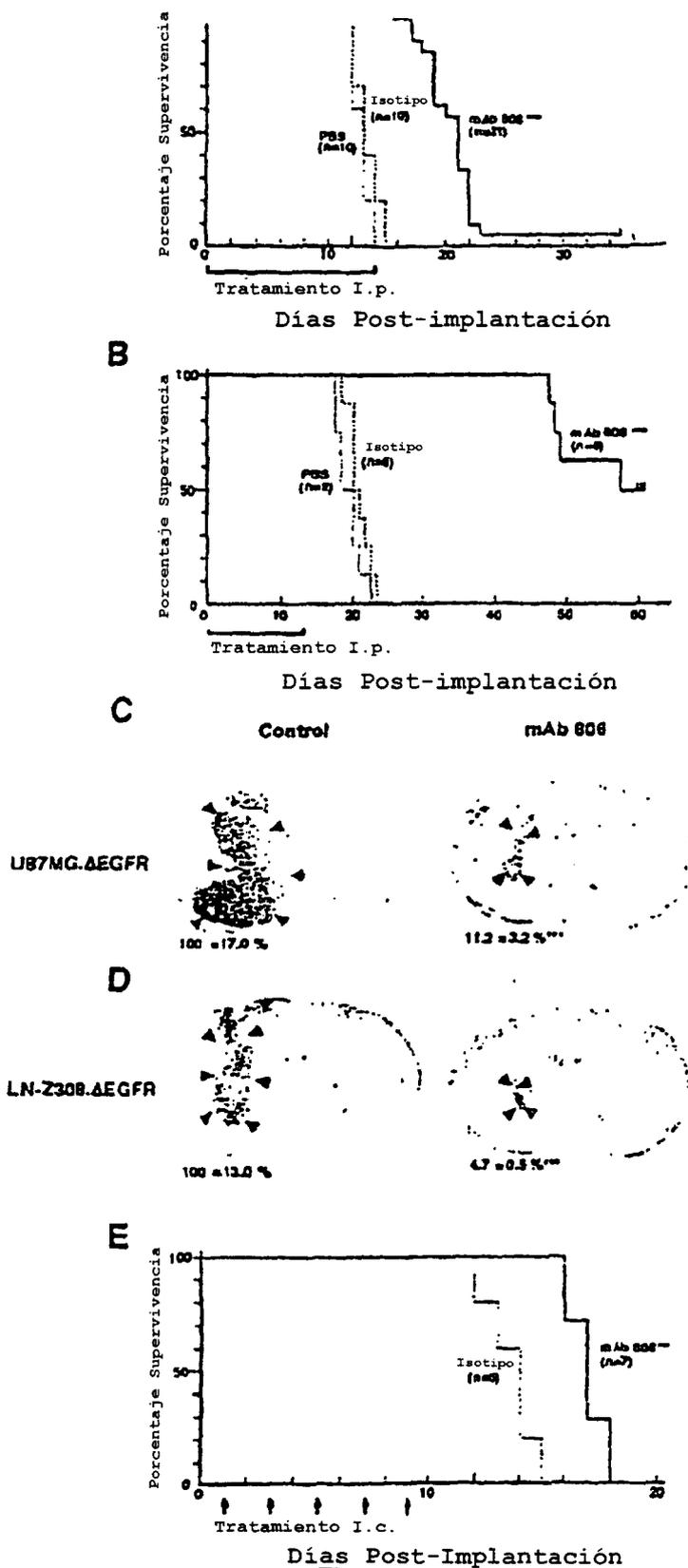


Fig. 25

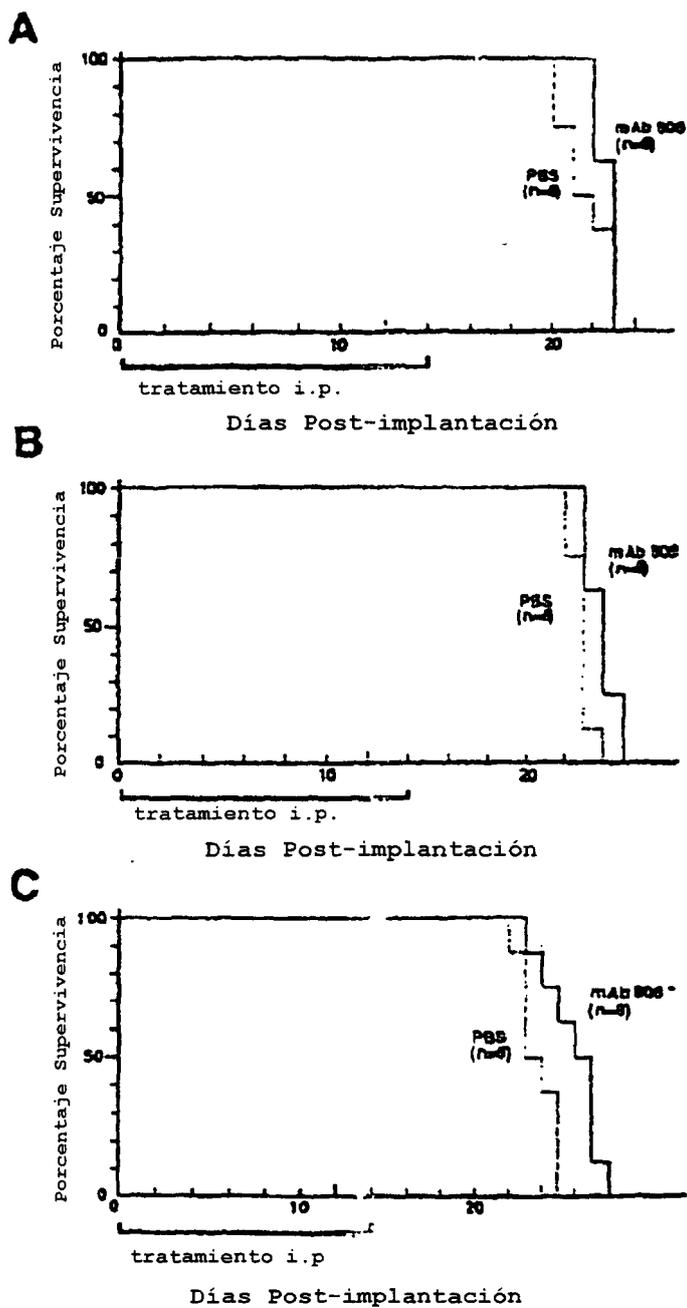


Fig. 26

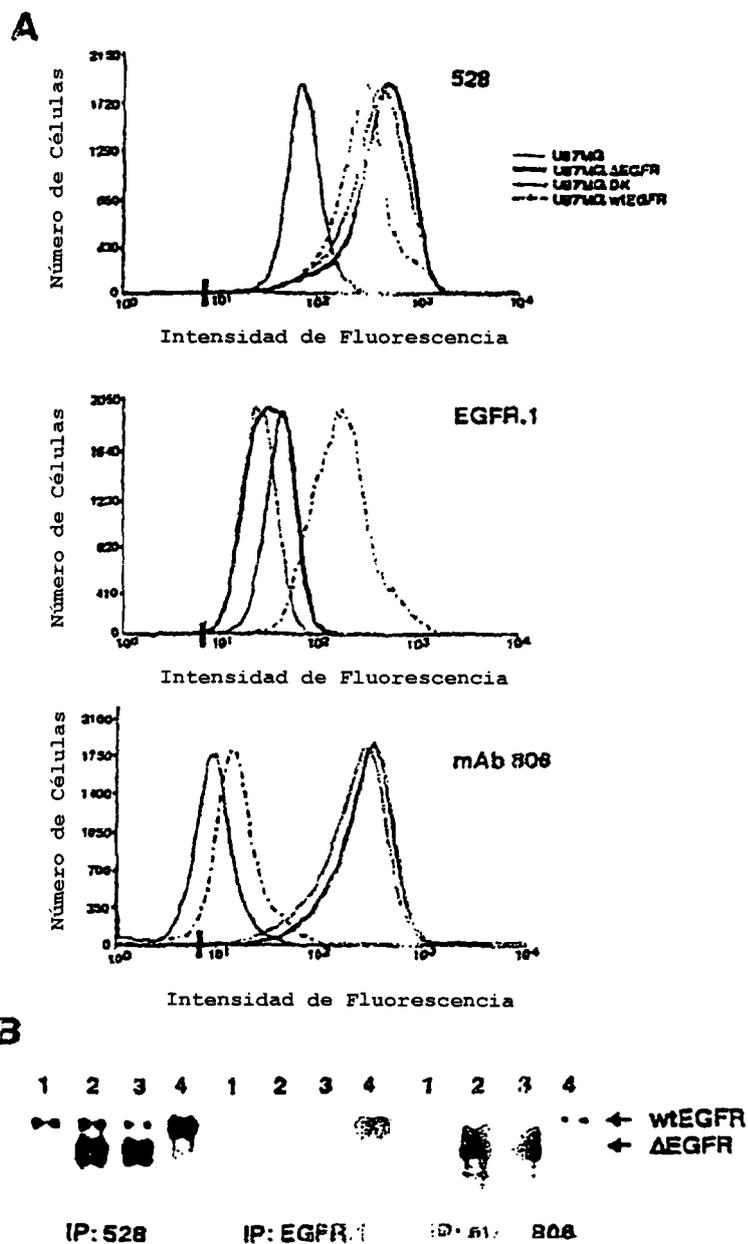


Fig. 27

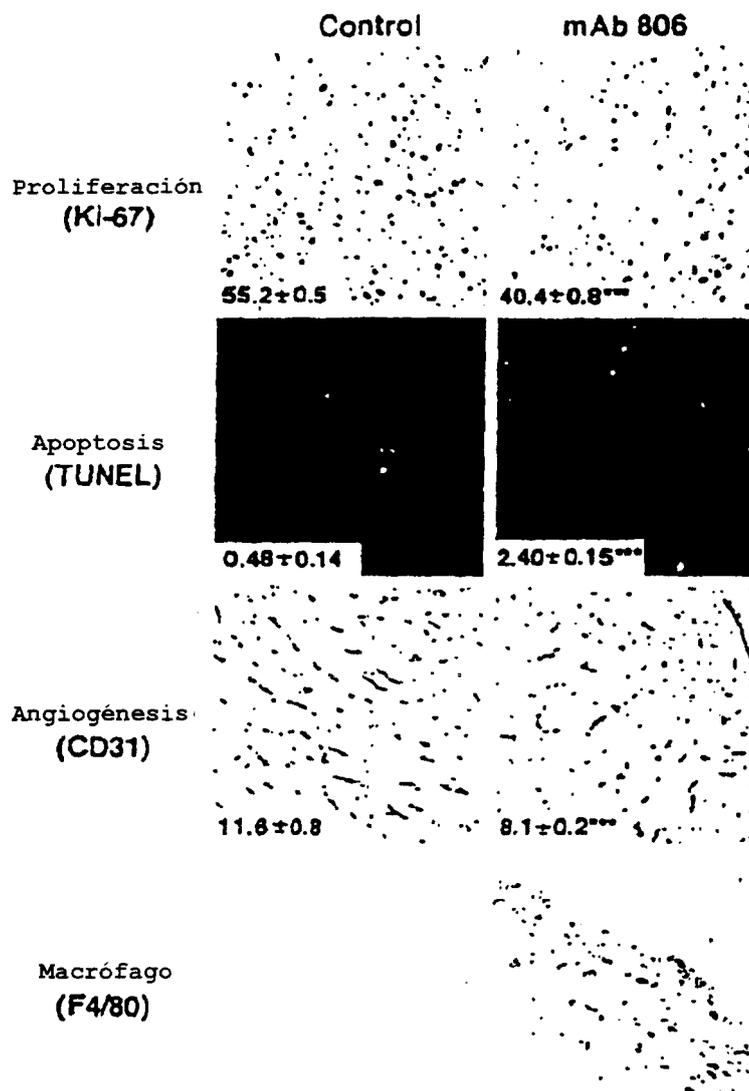


FIG28

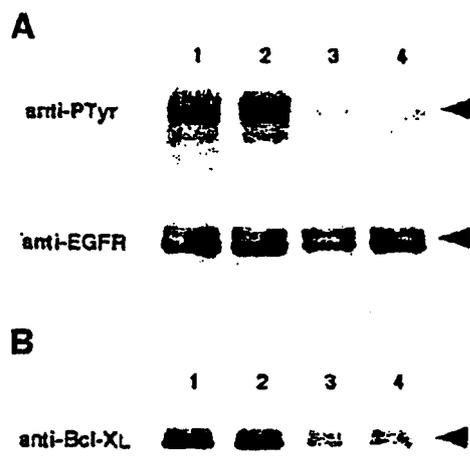
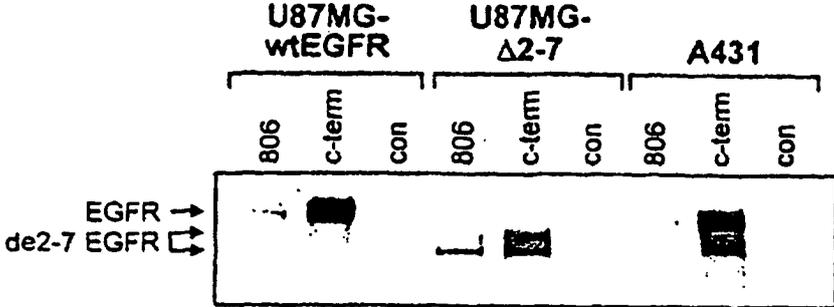
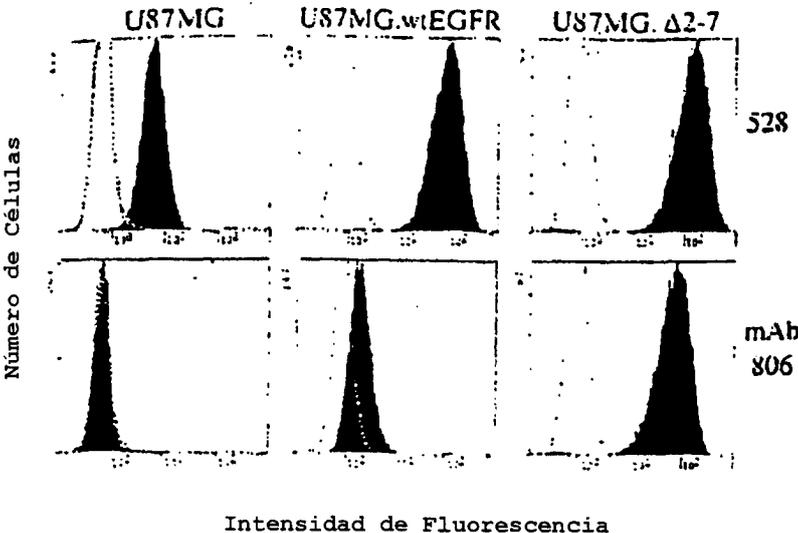
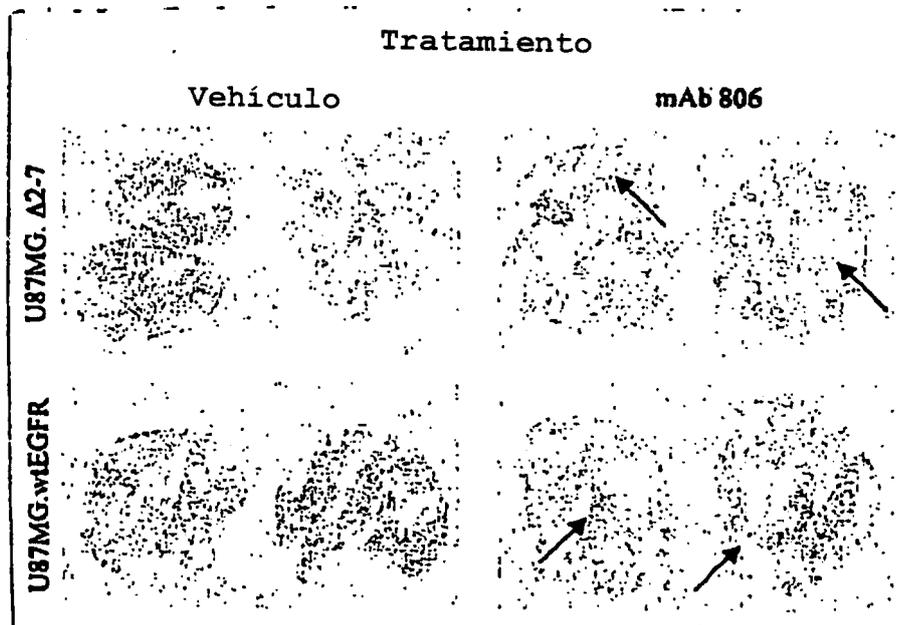


Fig. 29





mAb para EGFR ESPECÍFICO DEL TUMOR

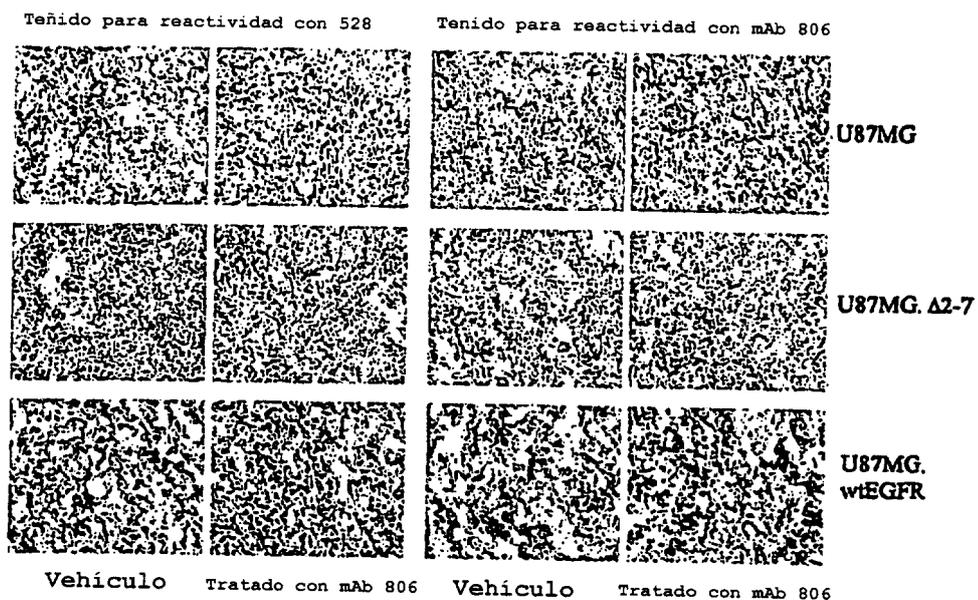


Fig. 33

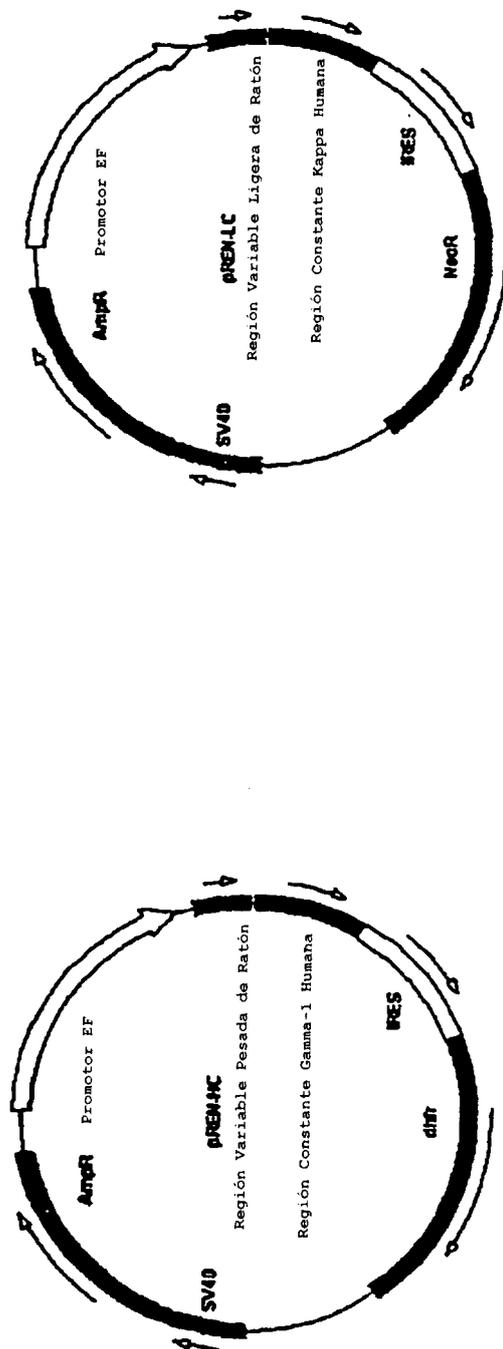


Fig. 34

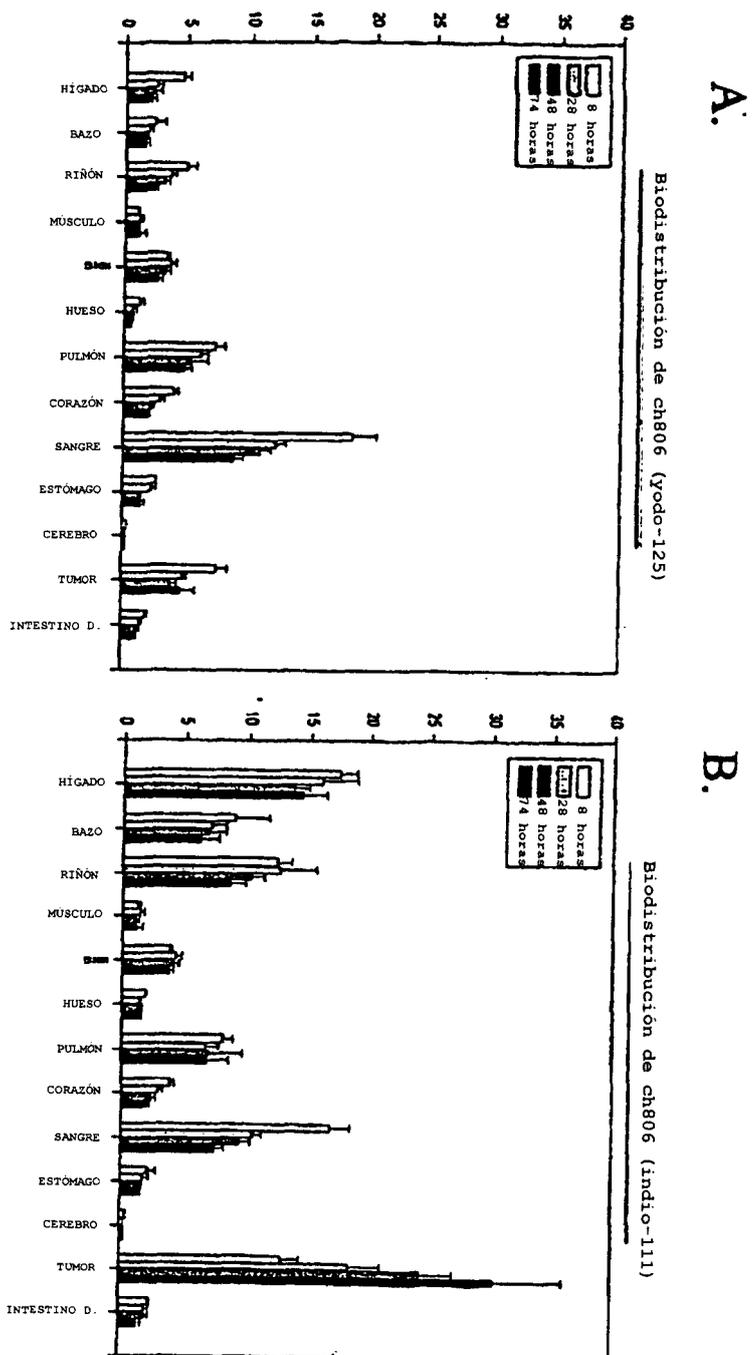
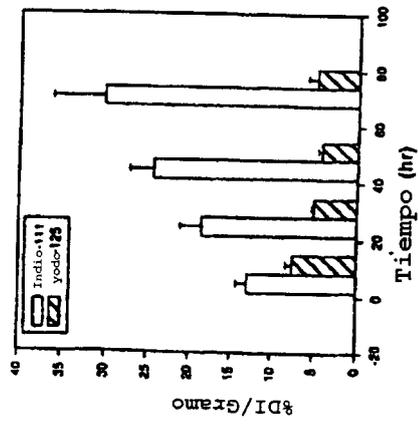


Fig. 35

A.

%DI/Gramo Tejido Tumor



B.

ch806-Razón Tumor a Sangre

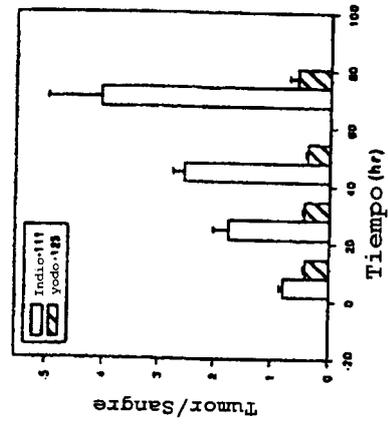
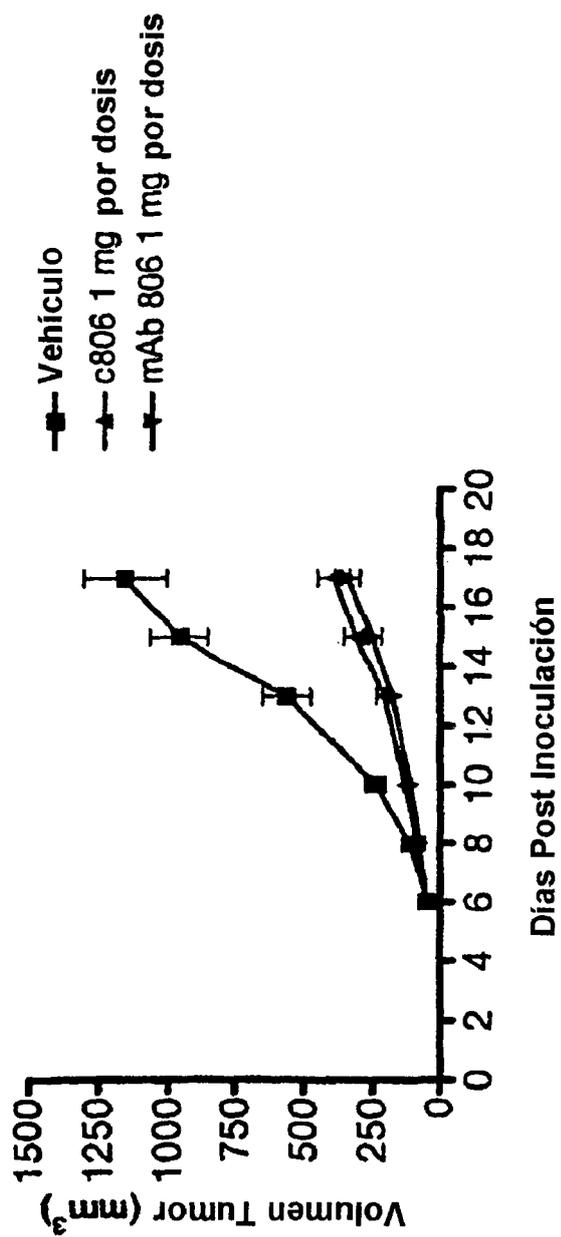


Fig. 36



Anticuerpo Inyectado los Días: 6, 8, 10, 13 y 15

Fig. 37

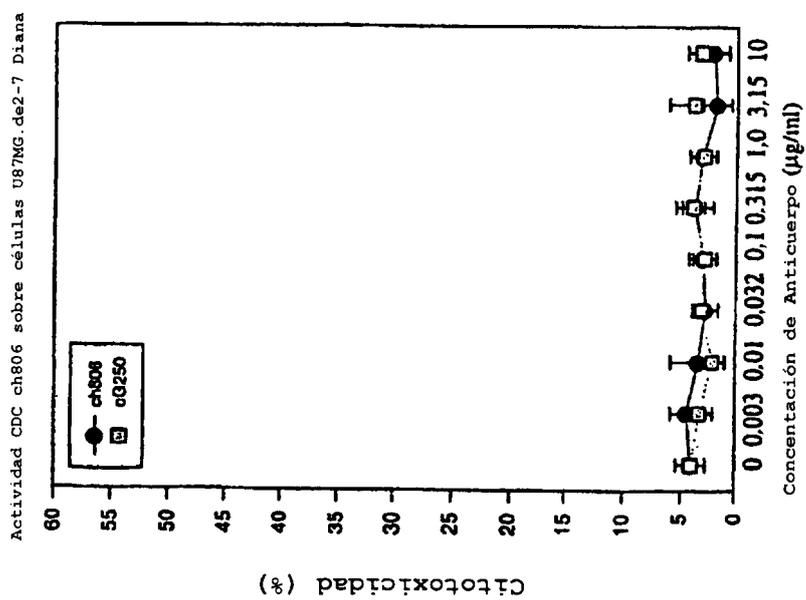
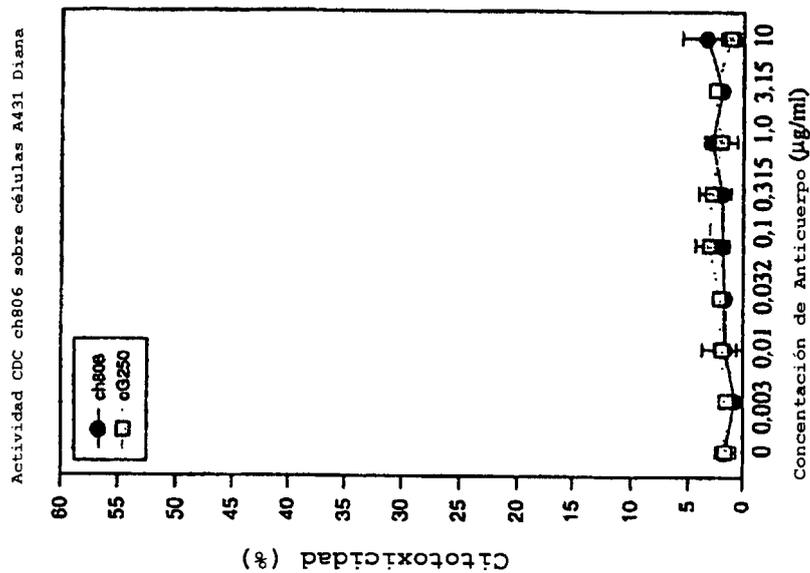


Fig. 38

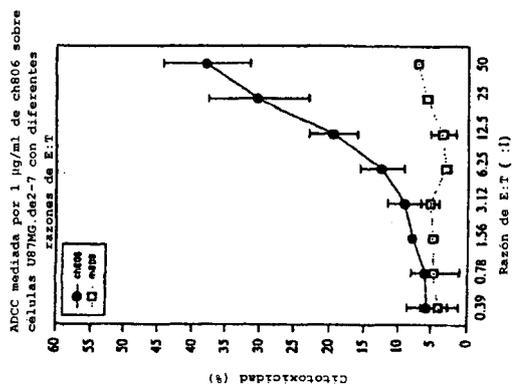
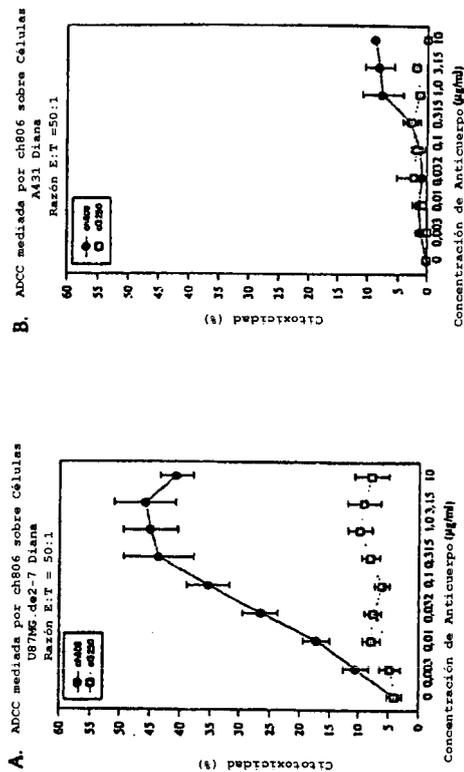
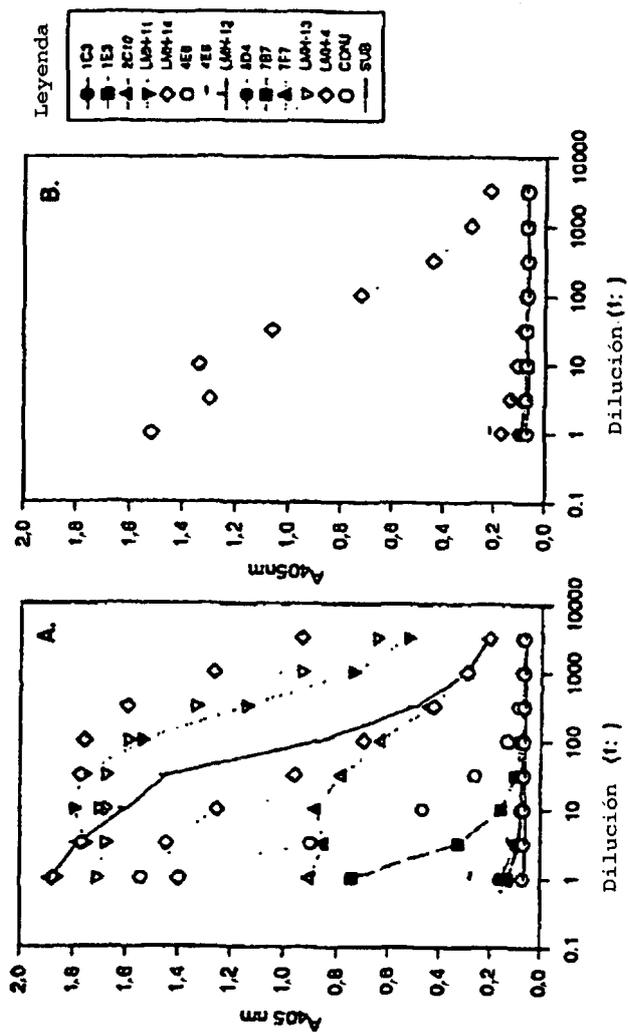


Fig. 39

Fig. 40



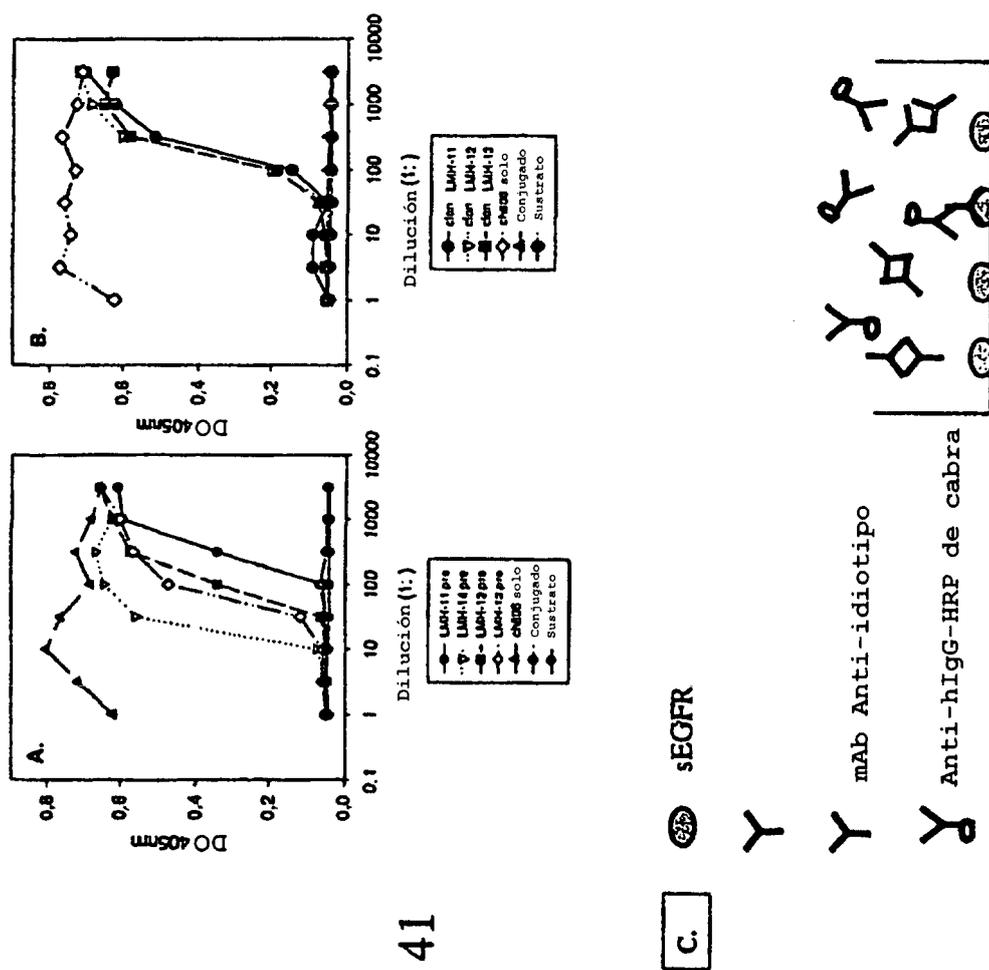


Fig. 41

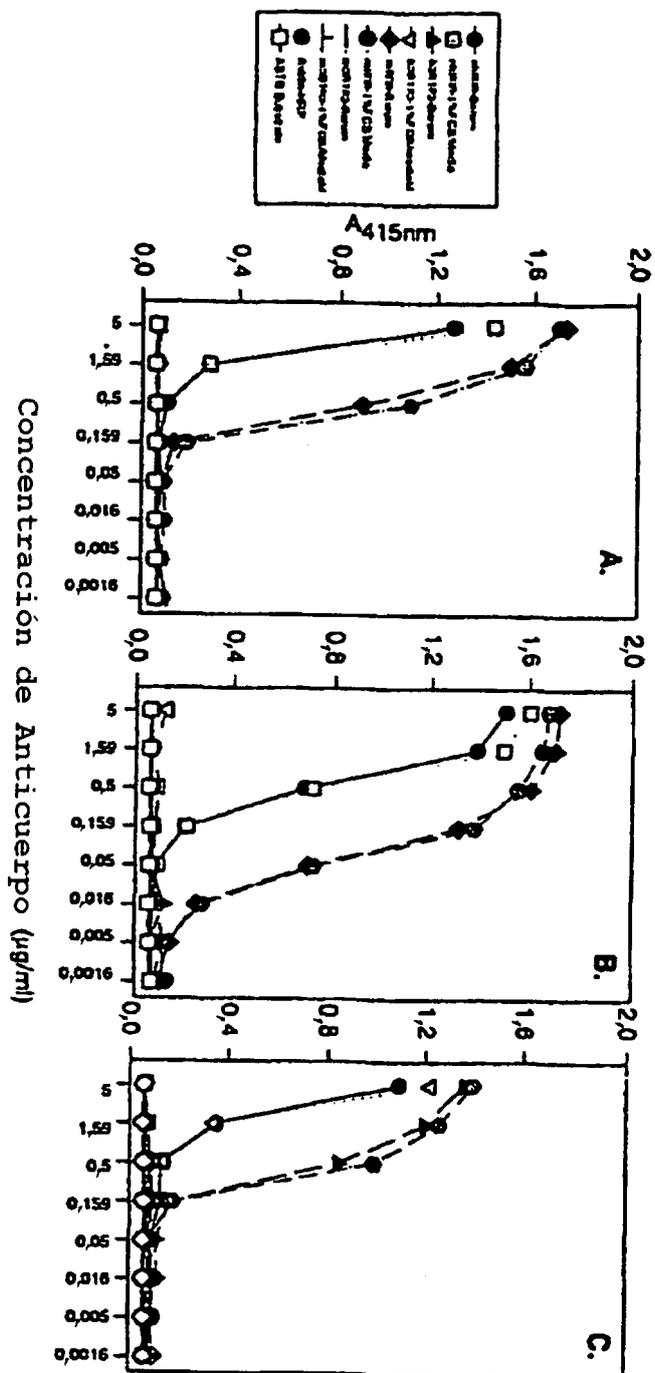
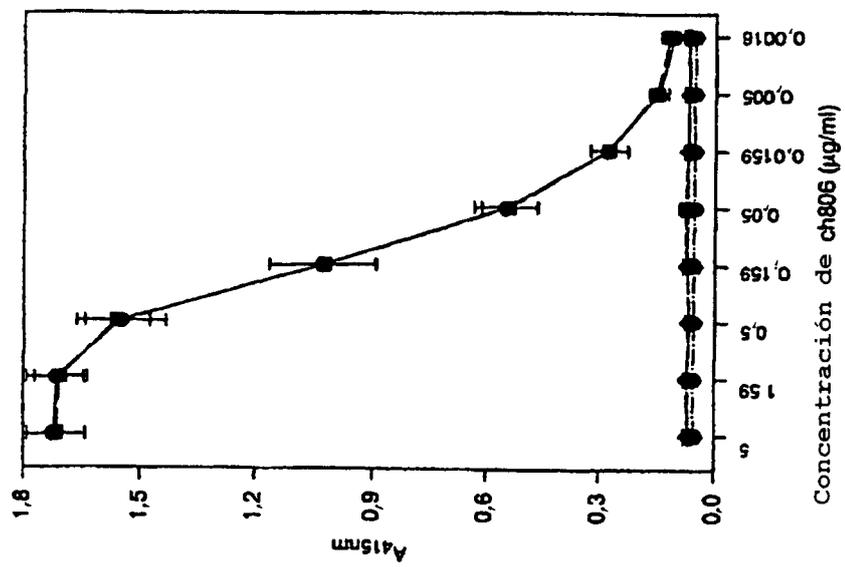


Fig. 42

Fig. 44

no tratado
desglicosilado

Fig. 43



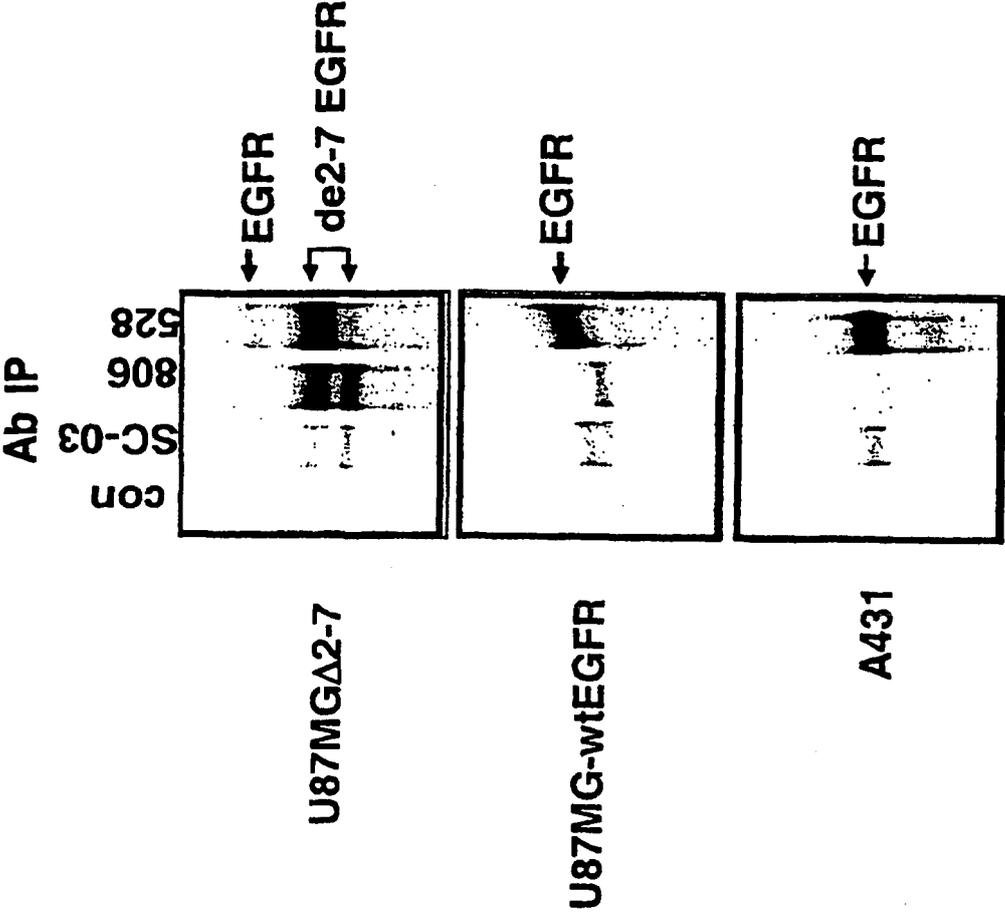
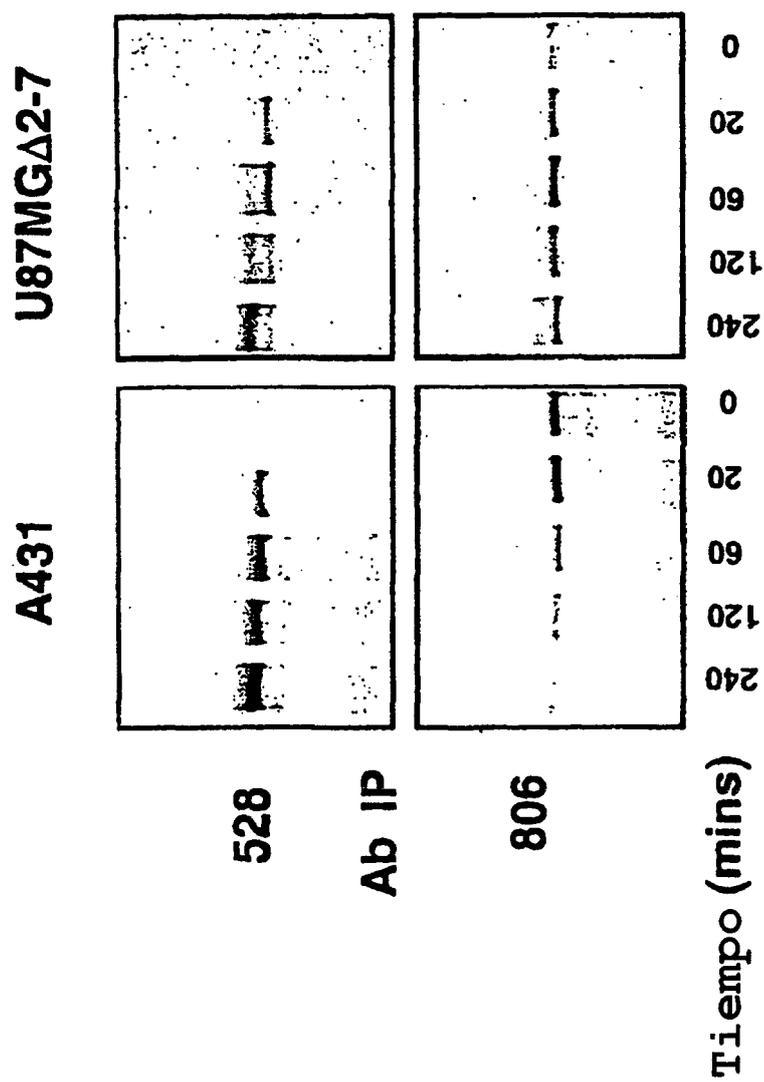


Fig. 45

Fig. 46



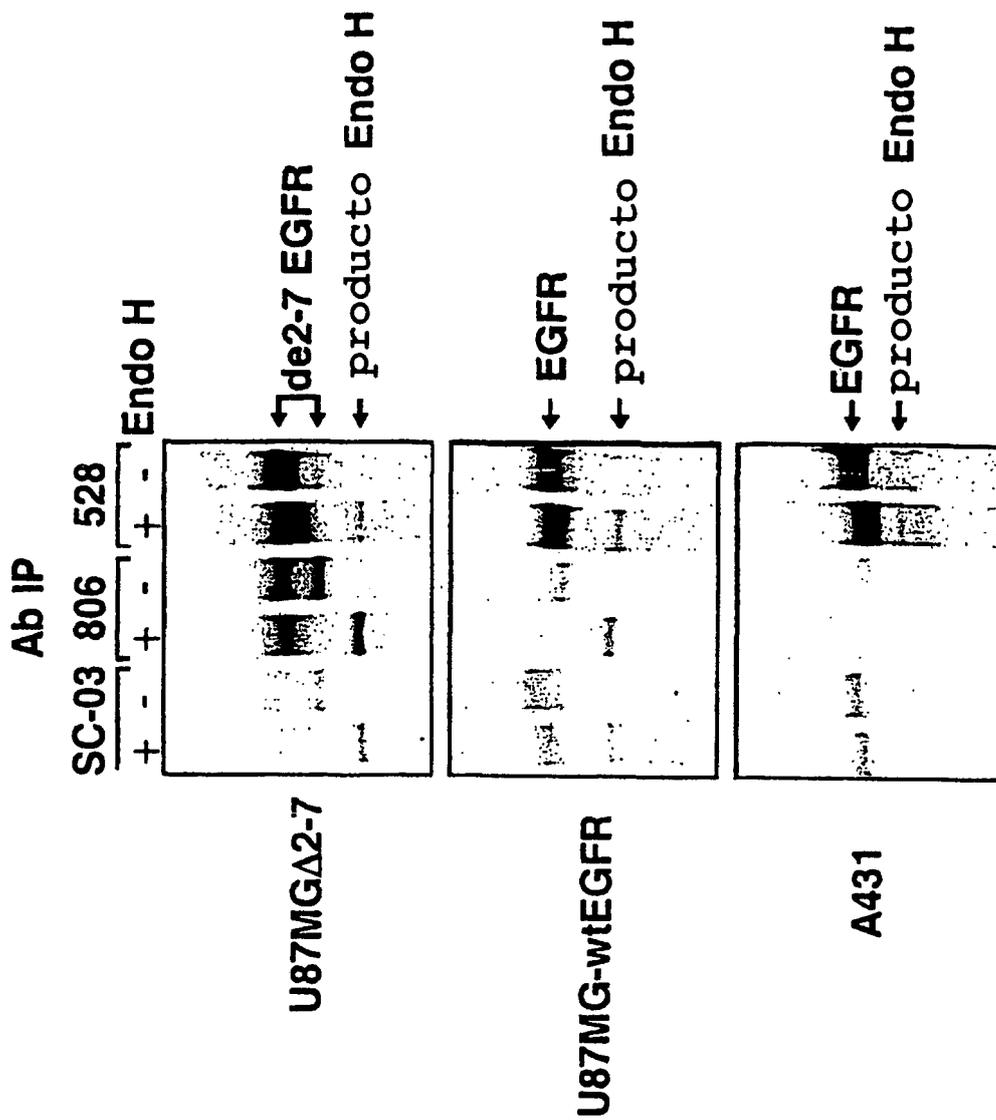
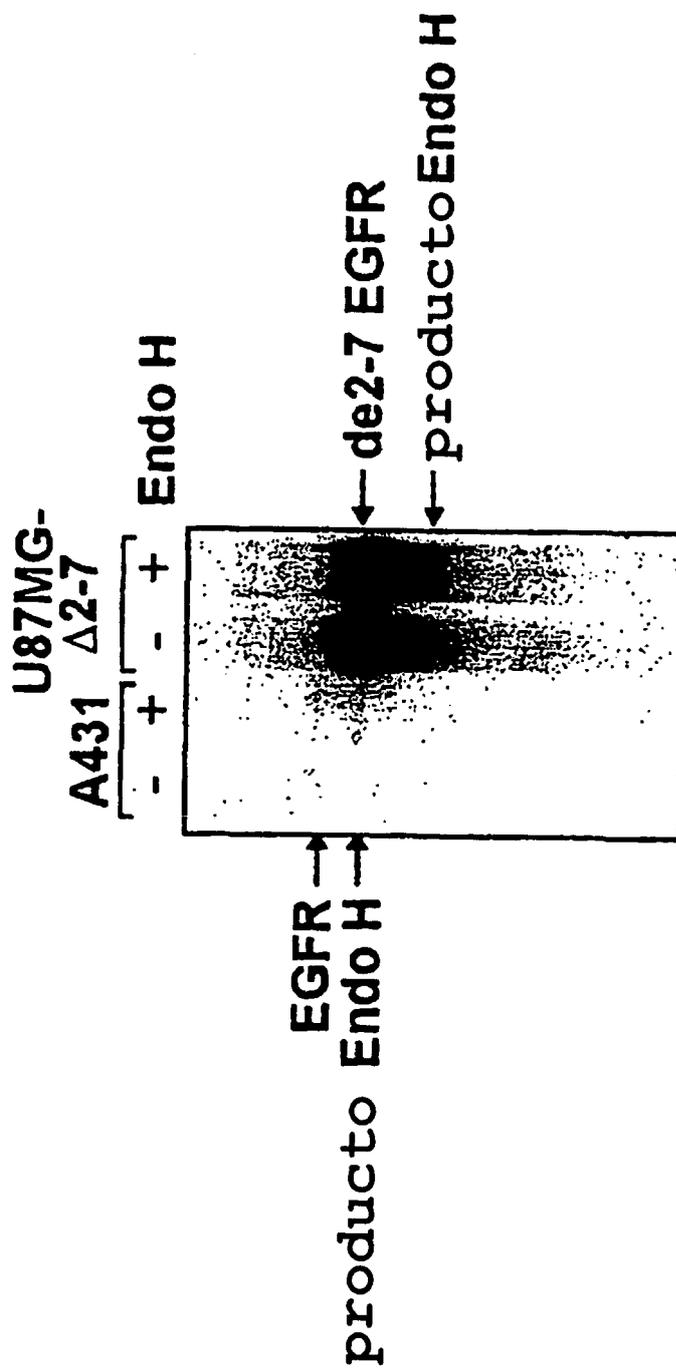


Fig. 47

Fig. 48



ES 2 334 494 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Ludwig Institute for Cancer Research
- 5 <120> Proteínas de Unión Específica y sus Usos
- <130> AHB/FP6192124
- 10 <140> EP 02739258.8
<141> 2002-05-13
- <150> PCT/US02/15185
- 15 <151> 2002-05-13
- <150> US 60/290,410
<151> 2001-05-11
- 20 <150> US 60/326,019
<151> 2001-09-28
- 25 <150> US 60/342,258
<151> 2001-12-21
- <160> 12
- 30 <170> FastSEQ para Versión 4.0 de Windows
- <210> 1
- 35 <211> 402
<212> ADN
<213> *Mus musculus*
- 40 <400> 1

```
45 atgagagtgc tgattctttt gtggctgttc acagcctttc ctggtgtcct gtctgatgtg 60
cagcttcagg agtcgggacc tagcctggtg aaaccttctc agtctctgtc cctcacctgc 120
actgtcactg gctactcaat caccagtgat tttgcctgga actggatccg gcagtttcca 180
ggaaacaagc tggagtggat gggctacata agttatagtg gtaacactag gtacaacca 240
tctctcaaaa gtcgaatctc taccactcga gacacatcca agaaccaatt cttcctgcag 300
ttgaattctg tgactattga ggacacagcc acatattact gtgtaacggc gggacgcggg 360
tttccttatt ggggccaagc gactctggtc actgtctctg ca 402
```

- 50 <210> 2
<211> 134
55 <212> PRT
<213> *Mus musculus*

60

65

ES 2 334 494 T3

<400> 2

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

<210> 3

25 <211> 384

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

30 <400> 3

35 atggtgtcca cagctcagtt ccttgcatlc ttgttgcttt ggtttccagg tgcaagatgt 60
 gacatcctga tgaccaatc tccatcctcc atgtctgtat ctctgggaga cacagtcagc 120
 atcacttgcc attcaagtca ggacattaac agtaatatag ggtgggtgca gcagagacca 180
 gggaaatcat ttaagggcct gatctatcat ggaaccaact tggacgatga agttccatca 240
 aggttcagtg gcagtgatc tggagccgat tattctctca ccatcagcag cctggaatct 300
 gaagattttg cagactatta ctgtgtacag tatgctcagt ttccgtggac gttcgggtgga 360
 ggcaccaagc tggaaatcaa acgt 384

40

<210> 4

<211> 128

<212> PRT

45 <213> *Mus musculus*

<400> 4

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

65

ES 2 334 494 T3

<210> 5
<211> 14
<212> PRT
5 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> sintética
10 <223> biotilada en la posición 1

<400> 5
15

Asx Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His
1 5 10

20 <210> 6
<211> 14
<212> PRT
25 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> sintética
30 <223> biotilada en la posición 13

<400> 6
35

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His Asx
1 5 10

40 <210> 7
<211> 6149
<212> ADN
45 <213> Secuencia Artificial

<220>
50 <223> vector sintético

55

60

65

ES 2 334 494 T3

<400> 7

	ctcagagagcg	ggcagtgagc	gcaacgcaat	taatgtgagt	tagctcactc	attaggcacc	60
5	ccaggtctta	cactttatgc	tcccggctcg	tatgttgtgt	ggagatgtg	agcggataac	120
	aatttcacac	agaattcgtg	aggctccggt	gcccgtcagt	gggcagagcg	cacatcgccc	180
	acagtccccg	agaagttggg	gggaggggtc	ggcaattgaa	ccggtgccta	gagaaggtgg	240
	cgcggggtaa	actgggaaag	tgatgtcgtg	tactggctcc	gcctttttcc	cgaggggtggg	300
	ggagaaccgt	atataagtgc	agtagtcgcc	gtgaacgttc	tttttgcgaa	cggttttgcc	360
	gccagaacac	aggtaagtgc	cgtgtgtggt	tcccgcgggc	ctggcctctt	tacgggttat	420
10	ggcccttcg	tgccttgaat	tacttccacg	ccccgtgctg	cagtacgtga	ttcttgatcc	480
	cgagcttcgg	gttggaagtg	ggtgggagag	ttcgaggcct	tgcgcttaag	gagccccttc	540
	gcctcgcgct	tgagttgagg	cctggcctgg	gcgctggggc	cgccgcgtgc	gaatctggtg	600
	gcaacctcgc	gcctgtctcg	ctgctttcga	taagtctcta	gccatttaaa	atttttgatg	660
	acctgctcgc	acgctttttt	tctggcaaga	tagtcttgta	aatgcggggc	aagatctgca	720
15	cactggtatt	tcggtttttg	gggcccggcg	cggcgacggg	gcccgtgcgt	cccagcgcac	780
	atgttcggcg	aggcggggcg	gccaccgaga	atcggacggg	ggtagctcca	840	
	agctggcccg	cctgctctgg	tgcctggcct	cgcgccgccc	tgtatcgccc	cgccctgggc	900
20							
	ggcaaggctg	gcccggctcg	caccagttgc	gtgagcggaa	agatggccgc	ttcccggccc	960
	tgctgcaggg	agctcaaaa	ggaggacgcg	gcgctcggga	gagcggcg	gtgagtcacc	1020
	cacacaaag	aaaaggcct	ttccgtctc	agccgtcgt	tcagtgtact	ccacggagta	1080
25	ccgggcgccc	tccaggcacc	tcgattagtt	ctcagcttt	tggagtacgt	cgtctttagg	1140
	ttggggggag	gggttttatg	cgatggagtt	tcccacact	gagtggtgg	agactgaagt	1200
	taggccagct	tggcacttga	tgttaattct	cttggaaatt	gccctttttg	agtttggatc	1260
	ttggttcatt	ctcaagcctc	agacagtgg	tcaaagtttt	tttcttccat	ttcaggtgta	1320
	cgcgctcgcg	gaagcttag	tttaaagcgc	gccaccatgg	tgtccacagc	tcagttcctt	1380
	gcattcttgt	tgctttggtt	tccaggtgca	agatgtgaca	tcctgatgac	ccaatctcca	1440
30	tcctccatgt	ctgtatctct	gggagacaca	gtcagcatca	cttgccattc	aagtcaggac	1500
	attaacagta	atataggtg	gttgcagcag	agaccagga	aatcatttaa	gggcctgatc	1560
	tatcatggaa	ccaacttqga	cgatgaagtt	ccatcaaggt	tcagtggcag	tggatctgga	1620
	gccgattatt	ctctcaccat	cagcagcctg	gaatctgaag	atthtgcaga	ctattactgt	1680
	gtacagcatg	ctcagtttcc	gtggacgttc	ggtggaggca	ccaagctgga	aatcaaacgg	1740
35	gtgagtggat	ccatctggga	taagcatgct	gttttctgtc	tgtccctaac	atgcctgtg	1800
	attatgcgca	aacaacacac	ccaagggcag	aactttggtt	cttaaacacc	atcctgtttg	1860
	cttctttcct	caggaactgt	ggctgcacca	tctgtcttca	tcttcccgcc	atctgatgag	1920
	cagttgaaat	ctggaactgc	ctctgttgtg	tgcctgctga	ataacttcta	tcccagagag	1980
	gccaaagtac	agtggaaaggt	ggataacgcc	ctccaatcgg	gtaactccca	ggagagtgtc	2040
	acagagcagg	acagcaagga	cagcacctac	agcctcagca	gcaccctgac	gctgagcaaa	2100
40	gcagactacg	agaaacacaa	agtctacgcc	tgcgaagtca	cccatcaggg	cctgagctcg	2160
	cccgtcacaa	agagcttcaa	caggggagag	tgttgagcta	gaactaacta	actaagctag	2220
	caacggtttc	cctctagcgg	gatcaattcc	gcccccccc	cctaacgtta	ctggccgaag	2280
	ccgcttgaa	taaggccggt	gtgcgtttgt	ctatatgtta	ttttccacca	tattgcccgtc	2340
45							
50							
55							
60							
65							

ES 2 334 494 T3

ttttggcaat gtgagggccc ggaaacctgg cctgtcttc ttgacgagca ttcctagggg 2400
 tctttcccct ctcgccaaag gaatgcaagg tctgttgaat gtcgtgaagg aagcagtcc 2460
 tctggaagct tcttgaagac aaacaacgct tgtagcgacc ctttgcaggc agcggaaacc 2520
 cccacctggc gacaggtgcc tctgcgcca aaagccacgt gtataagata cacctgcaaa 2580
 5 ggcggcacia cccagtgcc acgttgtgag ttggatagtt gtgaaagag tcaaatggct 2640
 ctctcaagc gtattcaaca aggggctgaa ggatgccag aaggtacccc attgtatggg 2700
 atctgatctg gggcctcgtt gcacatgctt tacgtgtgtt tagtcgaggt taaaaaacgt 2760
 ctaggccccc cgaaccacgg ggacgtggtt ttcctttgaa aaacacgata ataccatggt 2820
 10 tgaacaagat ggatgacac caggttctcc ggcgcttggt gtggagaggc tattcggtca 2880
 tgaactggca caacagacia tccgctgctc tgatgccgcc gtgttccggc tgtcagcgca 2940
 gggggcggcg gttctttttg tcaagaccga cctgtccggg gccctgaatg aactgcagga 3000
 cgaggcagcg cgcctatcgt ggctggccac gacgggcttt ccttgcgcag ctgtgctcga 3060
 cgttgtcact gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccgg ggcaggatct 3120
 cctgtcatct caccttctc ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg caatgcggcg 3180
 15 gctgcatacg cttgatccgg ctacctgcc attcagacc caagcgaaac atcgcatcga 3240
 gcgagcacgt actcggatgg aagccggctc tctcagatcag gatgatctgg acgaagagca 3300
 tcaggggctc gcgccagccg ccgattccga caggctcaag gcgcgcatgc ccgacggca 3360
 ggatctcgtc gtgacctatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatgggtg aaaaaggccg 3420
 cttttctgga ttcatcgact gtggcgggct ggggtgtggc gaccgctatc aggacatagc 3480
 gttggctacc cgtgatattg ctgaagagct tggcggcga tgggctgacc gcttccctct 3540
 20 gctttacggt atcgccgctc ccgattccga gcgcatcgc ttctatcgc ttcttgacga 3600
 gttcttctga gtcgatcgac ctggcgtaat agcgaagagg cccgaccga tcgcccttc 3660
 caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc ataaagcgcg 3720
 gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctc agcgcgccct 3780
 cctttcgtct tcttccctc ctttctcgc acgttcgccc gctttccccc tcaagctcta 3840
 25 aatcgggggc tccctttagg gttccgattt agtgctttac ggacactcga ccccaaaaaa 3900
 cttgattagg gtgatggttc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggg ttttcgcctt 3960
 tgacgttggg gtccacgctt ttaatatgtg gactcttgtt ccaaactgga acaactca 4020
 accctatctc ggtctattta taagggattt tgccgatttc ggccatttgg ttaaaaaatg 4080
 agctgattta acaaaattta acgcgaattt taacaaata ttaacgctta caatttaggt 4140
 30 ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctatatctg ttatttttc taaatacatt 4200
 caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa 4260
 ggaagagtat gactattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt 4320
 gccttactgt tttgtctcac ccagaaacgc tgggtgaaag aaaagatgct gaagatcagt 4380
 tgggtgcaac agtgggttac atctcaacag cggtaagatc cttgagaggt 4440
 35 ttgccccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtgagcgg 4500
 tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggctg ccgcatacac tattctcaga 4560
 atgacttggg tgagtactca ccagtcacag aaaagcatat tacggatggc atgacagtaa 4620
 gagaattatg cagtgtctcc ataaccatga gtgataaac tgcggccaac ttactttctga 4680

caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa 4740
 40 ctgccttga tctgtgggaa ccgagctgta atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca 4800
 ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaac attaactggc gaactactta 4860
 ctctagcttc ccgcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaaagt gaggaccac 4920
 ttctgcctc ggcccttcg gctggctggt ttattgtgta taaatctgga gccggtgagc 4980
 gtgggtctcg cgtatcatt gcagactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtga 5040
 45 ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga 5100
 taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca agttactca tataacttt 5160
 agattgat taaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata 5220
 atctcatgac caaaatccct taactgtgag tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag 5280
 aaaagatcaa aggatgttct tgagatcctt tttttctgca cgtaatctgc tgcctgcaaa 5340
 caaaaaacca ccgctaccag cgggtggttg tttgccggat caagagctac caactctttt 5400
 50 tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagttagacc 5460
 gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgct acatacctcg ctctgcta 5520
 cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtctgt cttaccgggt tggactcaag 5580
 acgatagtta ccgataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc 5640
 cagcttgag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag 5700
 55 cgcacagctt ccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca ggtcggaa 5760
 aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg 5820
 gtttcgcccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tgcctcgggg ggcggagcct 5880
 atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttctct gccttttctt ggccttttgc 5940
 tcacatgttc tttcctgctt tatccctgta ttctgtggat aaccgtatta ccgcttttga 6000
 60 gtgagctgat accgctcggc gcagccgaac gaccgagcgc agcagctcag tgagcagga 6060
 agcgaagag cgcacaatac gcaaacccgc tctccccgc cgttggccga ttcattaatg 6120
 caggtatcac gaggcccttt cgtcttcc 6149

ES 2 334 494 T3

<210> 8

<211> 6625

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vector sintético

10

<400> 8

```

15      ctcgagagcg ggcagtgagc gcaacgcaat taatgtgagt tagctcactc attaggcacc 60
      ccaggcttta cactttatgc tcccggctcg tatgtttgtg ggagattgtg agcggataac 120
      aatttcacac agaattcgtg aggctccggg gcccgtcagt ggcagagcg cacatcgccc 180
      acagtccccg agaagtggg gggaggggct gccaatgaa ccggtgccta gagaaggtgg 240
      cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc gcctttttcc cgagggtggg 300
      ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc tttttcgcaa cgggtttgcc 360
20      gccagaacac aggtaagtgc cgtgtgtggt tcccgcgggc ctggcctctt tacgggttat 420
      ggcccttgcg tgccttgaat tacttccacg cccctggctg cagtacgtga ttcttgatcc 480
      cgagcttcgg gttggaagtg ggtgggagag ttcgaggcct tgcgcttaag gagecccttc 540
      gcctcgtgct tgagttgagg cctggcctgg gcgctggggc cgcgcgctgc gaatctgggtg 600
      gcaccttcgc gcctgtctcg ctgctttcga taagtctcta gccatttaa atttttgatg 660
25      acctgctgcg acgctttttt tctggcaaga tagtcttcta aatgcggggc aagatctgca 720
      cactggattt tcggtttttg gggcccgggg cgcgcgacgg gccctgctg cccagcgcac 780
      atgttcggcg aggcggggcc tgcgagcgg gccaccgaga atcggacggg gglagtctca 840
      agctggcccg cctgctctcg tgcctggcct cgcgcgcggc tqtatcgccc cgccctgggc 900
      ggaagggctg gcccggtcgg caccagtgc gtgagcggaa agatggcgc tccccggccc 960
30      tctgcaagg agctcaaaat ggagacgcg gcgctcggga gagcgggcbg gtgagtcacc 1020
      cacacaaagg aaaaggcct ttcgctcctc agccgtcgtc tcatgtgact ccacggagta 1080
      ccggcgcccg tccaggcacc tcgattagtt ctcgagcttt tggagtacgt cgtctttagg 1140
      ttggggggag gggttttatg cgatggagtt tccccacact gagtgggtgg agactgaagt 1200
      taggccagct tggcacttga tgtaattctc ctgggaattt gccctttttg agtttgagt 1260
      ttggttcatt ctcaagcctc agacagtggg tcaaagtttt tttcttccat ttcagggtga 1320
35      cgcgtctcgg gaagctttag tttaaacgcc gccaccatga gagtgcctgat tcttttggg 1380
      ctgttcacag ccttctctgg tgtctctgct gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctagc 1440
      ctggtgaaac cttctcagac tctgtccctc acctgcactg tcaactggcta ctcaatcacc 1500

40      agtgattttg cctggaactg gatccggcag tttccaggaa acaagctgga gtggatgggc 1560
      tacataagtt atagtggtaa cactaggtac aaacctctc tcaaaagtcb aatctctatc 1620
      actcgagaca catccaagaa ccaattcttc ctgcagttga attctgtgac tattgaggac 1680
      acagccacat attactgtgt aacggcggga cgcgggtttc cttattgggg ccaagggact 1740
      ctggtcactg tctctgcaca gtgagtggtt cctctgcgcc tgggcccagc tctgtcccac 1800
      accgcggtca catggcacca cctctcttgc agcctccacc aagggcccat cgtctctccc 1860
45      cctggcaccb tctccaaga gcacctctg gggcacagcg gccttgggtc gcctgggtcaa 1920
      ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca ggcgcccga ccagcggcgt 1980
      gcacaccttc ccggtgtcc tacagtctc aggactctac tccctcagca gcgtggtgac 2040
      cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc aacgtgaatc acaagcccag 2100
      caacaccaag gtggacaaga aagttagacc caaatctgt gacaaaactc acacatgccc 2160
      accgtgcccc gcacctgaac tcttgggggg accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaccc 2220
50      caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtggtgg tggacgtgag 2280
      ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataacgc 2340
      caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgggtggtca gcgtcctcac 2400
      gctcctgca caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc 2460
      cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca 2520
55      ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag aaccaggtca gcctgacctg 2580
      cctggtcaaa ggctcttatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc 2640
      ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttctctca 2700
      cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcaaggg aacgtcttct catgctccgt 2760

```

60

65

ES 2 334 494 T3

	gatgcatgag	gctctgcaca	accactacac	gcagaagagc	ctctccctgt	ctccgggtaa	2820
	atgagctaga	aactaactaa	gctagcaacg	gtttccctct	agcgggatca	attccgcccc	2880
	ccccccctaa	cgttactggc	cgaagccgct	tggaataaag	ccgggtgtcg	tttgtctata	2940
	tgttattttc	caccatattg	ccgtcttttg	gcaatgtgag	ggcccggaaa	cctggccctg	3000
5	tcttcttgac	gagcattcct	aggggtcttt	cccctctcgc	caaaggaatg	caaggtctgt	3060
	tgaatgtcgt	gaaggaagca	gttccctcgg	aagcttcttg	aagacaaaac	acgtctgtag	3120
	cgaccctttg	caggcagcgg	aacccccac	ctggcgacag	gtgcctctgc	ggccaaaagc	3180
	cacgtgtata	agatacacct	gcaaaggcgg	cacaacccca	gtgccacgtt	gtgagttgga	3240
	tagttgtgga	aagagtcaaa	tggctctcct	caagcgtatt	caacaagggg	ctgaaggatg	3300
10	cccagaaggt	accccattgt	atgggatctg	atctggggcc	tcggtgacaa	tgctttacgt	3360
	gtgtttagtc	gaggttaaaa	aacgtctagg	ccccccgaac	cacggggacg	tggttttctt	3420
	ttgaaaaaca	cgataatacc	atggttcgac	cattgaaactg	catcgtcgc	gtgtcccaaa	3480
	atatggggat	tggcaagaac	ggagacctac	cctggcctcc	gctcaggaac	gagttcaagt	3540
	acttccaaag	aatgaccaca	acctcttcag	tggaaggtaa	acagaatctg	gtgattatgg	3600
	gtaggaanaa	ctggttctcc	attcctgaga	agaatcgacc	tttaaaggac	agaattaatg	3660
15	gttcgatata	gttctcagta	gagaactcaa	agaaccacca	cgaggagctc	attttcttgc	3720
	caaaagtttg	gatgatgcct	taagacttat	tgaacaaccg	gaattggcaa	gtaaagttaga	3780
	catggtttgg	atagtcggag	gcagttctgt	ttaccaggaa	gccatgaatc	aaccaggcca	3840
	cctcagactc	tttgtgacaa	ggatcatgca	ggaatttgaa	agtgcacagt	ttttccagca	3900
	aattgatttg	gggaaatata	aacttctccc	agaataccca	ggcgtcctct	ctgaggtcca	3960
20	ggaggaaaaa	ggcatcaagt	ataagtttga	agtctacgag	aagaaagact	aacagggaaga	4020
	tgctttcaag	ttctctgctc	ccctcctaaa	gctatgcatt	tttataagac	catgggactt	4080
	ttgctggctg	atcgacctgg	cgtaatagcg	aagaggcccg	caccgatcgc	ccttcccaac	4140
	agttgctcag	cctgaatggc	gaatgggacg	cgccctgtag	cgggcgatta	agcgcggcgg	4200
	gtgtggttgg	taocgcagc	gtgaccgcta	cacttgccag	cgccctagcg	cccgctcctt	4260
	tcgctttctt	cccttctctt	ctgccaccgt	tcgcccgtt	tccccgtcaa	gctctaaatc	4320
25	gggggctccc	tttaggggtc	cgatttagtg	ctttacggca	cctcgacccc	aaaaaacttg	4380
	attaggttga	tggttcacgt	agtgggcat	cgccctgata	gacggttttt	cgcttttgac	4440
	gttggagtcc	acgttcttta	atagtggact	cttgttccaa	actggaacaa	caactcaacc	4500
	tatctcggtc	tatttataag	ggattttgcc	gatttcggcc	tattggttaa	aaaatgagct	4560
	gatttaacaa	aatttaacgc	gaattttaac	aaaatattaa	cgcttacaat	ttaggtggca	4620
30	cttttcgggg	aaatgtgctc	ggaaccccta	tatttgttta	tttttctaaa	tacattcaaa	4680
	tatgtatccg	ctcatgagac	aataaccctg	ataaatgctt	caataatatt	gaaaaaggaa	4740
	gagtatgagt	atccaacatt	tccgtgtcgc	ccttattccc	ttttttgcgg	cattttgcct	4800
	tactgttttt	gctcaccag	aaacgctggt	gaaagtataa	gatgctgaag	atcagttggg	4860
	tgacagagtg	ggttacatcg	aactggatct	caacagcggg	aagatccttg	agagttttcg	4920
35	ccccgaagaa	cgttttccaa	tgatgagcac	ttttaaagtt	ctgctatgtg	gcgcggtatt	4980
	atccccgtat	gacgcggggc	aagagcaact	cggtcgcggc	atacactatt	ctcagaatga	5040
	cttggttag	tactcaccag	tcacagaaaa	gcatatttac	gatggcatga	cagtaagaga	5100
	attatgagtg	gctgccataa	ccatgagtg	taaacctgcg	gccaacttac	ttctgacaac	5160
	gatcggagga	ccgaaggagc	taaccgcttt	tttgacaaac	atgggggatc	atgtaactcg	5220
40	ccttgatcgt	tgggaaccgg	agctgaatga	agccatacca	aacgacgagc	gtgacaccac	5280
	gatgcctgta	gcaatggcaa	caacgttgcg	caaactatta	actggcgaac	tacttactct	5340
	agcttcccgg	caacaattaa	tagactggat	ggaggcggat	aaagttgcag	gaccacttct	5400
	gcgctcggcc	cttccggctg	gctggtttat	tgctgataaa	tctggagccg	gtgagcgtgg	5460
45	gtctcgcggt	atcattgcag	cactggggcc	agatggtaag	ccctcccgtg	tcgtagttat	5520
	ctacacgacg	gggagtcagg	caactatgga	tgaacgaaat	agacagatcg	ctgagatagg	5580
	tgccctactg	attaagcatt	ggtaaactgtc	agaccaagtt	tactcatata	tacttttagat	5640
	tgatttataa	cttcattttt	aatttaaaaag	gatctagggt	aagatccttt	ttgataatct	5700
	catgaccaaa	atcccctaac	gtgagttttc	gttccactga	gcgtcagacc	ccgtagaaaa	5760
	gatcaaaagg	tgttcttgag	atcctttttt	tctgcacgta	atctgctgct	tgcaaaacaaa	5820
50	aaaccaccgc	taccagcggg	ggtttggttg	ccggatcaag	agctaccaac	tctttttccg	5880
	aaggtaactg	gcttcagcag	agcgcagata	ccaaatactg	tccttctagt	gtagccgtag	5940
	ttagcccacc	acttcaagaa	ctctgtagca	ccgcctacat	acctcgcctc	gctaactcctg	6000
	ttaccagtgg	ctgctgccag	tggcgataag	tcgtgtctta	ccgggttggg	ctcaagacga	6060
	tagttaccgg	ataaggcgca	gcggtcgggc	tgaacggggg	gttcctgcac	acagcccagc	6120
55	ttggagcgaa	cgacctacac	cgaactgaga	tacctacagc	gtgagctatg	agaaaagcgc	6180
	acgcttcccg	aagggagaaa	ggcggacagg	tatccggtaa	gcggcagggt	cggaacagga	6240
	gagcgcacga	gggagcttcc	agggggaaac	gcctggtatc	tttatagtc	tgtcgggttt	6300
	cgccacctct	gacttgagcg	tcgatttttg	tgatgctcgt	cagggggggc	gagcctatgg	6360
	aaaaacgcca	gcaacgcggc	ctttttacgg	ttcctggcct	tttgctggcc	ttttgctcac	6420
60	atgttctttc	ctgcgttatc	ccctgattct	gtggataacc	gtattaccgc	ctttgagtga	6480
	gctgataccg	ctcgcgcag	ccgaacgacc	gagcgcagcg	agtcagttag	cgaggaagcg	6540
	gaagagcgcc	caatacgcaa	accgcctctc	cccgcgcggt	ggccgattca	ttaatgcagg	6600
	tatcacgagg	ccctttcgtc	ttcac				6625
65							

ES 2 334 494 T3

<210> 9

<211> 234

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> vector sintético

10

<400> 9

```

15      Met Val Ser Thr Ala Gln Phe Leu Ala Phe Leu Leu Leu Trp Phe Pro
      1          5          10          15
      Gly Ala Arg Cys Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser
      20      20          25          30
      Val Ser Leu Gly Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp
      35      35          40          45
      Ile Asn Ser Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ser Phe
      50      50          55          60
      Lys Gly Leu Ile Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Glu Val Pro Ser
      65      65          70          75          80
      Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
      85      85          90          95
      Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln His Ala
      100     100          105          110
      Gln Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
      115     115          120          125
      Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
      130     130          135          140
      Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
      145     145          150          155          160
      Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
      165     165          170          175
      Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
      180     180          185          190
      Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
      195     195          200          205
      His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
      210     210          215          220
      Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      225     230
  
```

<210> 10

45 <211> 463

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<223> vector sintético

55

60

65

ES 2 334 494 T3

<400> 10

5 Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Val
1 5 10 15
Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro
20 25 30
Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
35 40 45
10 Ser Asp Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu
50 55 60
Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro
65 70 75 80
15 Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95
Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ile Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
100 105 110
20 Tyr Cys Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125
Leu Val Thr Val Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
130 135 140
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
145 150 155 160
25 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
165 170 175
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
180 185 190
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Tyr Ser Val Pro Ser Ser Ser
195 200 205
30 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
210 215 220
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
225 230 235 240
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
245 250 255
35 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
260 265 270
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
275 280 285
40 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
290 295 300
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
305 310 315 320
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
325 330 335
45 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
340 345 350
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
355 360 365
50 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
370 375 380
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
385 390 395 400
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
405 410 415
55 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445
60 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 11

<211> 116

65 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

ES 2 334 494 T3

<400> 11

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

<210> 12

<211> 108

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

25

<400> 12

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

45

50

55

60

65