

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 809**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 17/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05732383 .4**
96 Fecha de presentación: **21.03.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1735348**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.12.2006**

54 Título: **Anticuerpo frente al receptor del factor de crecimiento epidérmico humano**

30 Prioridad:
19.03.2004 US 554555 P
02.11.2004 US 624264 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.10.2012

73 Titular/es:
IMCLONE LLC
180 VARICK STREET
NEW YORK, NY 10014, US

72 Inventor/es:
LIU, Meilin y
ZHU, Zhenping

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 387 809 T3

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

Anticuerpo frente al receptor del factor de crecimiento epidérmico humano.

Campo de la invención

5 La presente invención está dirigida a anticuerpos monoclonales que son específicos del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Estos anticuerpos se pueden usar para tratar, entre otros, enfermedades neoplásicas y trastornos hiperproliferativos.

Antecedentes de la invención

10 Aunque las células normales proliferan por la acción altamente controlada de las tirosina quinasas del receptor del factor de crecimiento (RTK) por sus respectivos ligandos, las células cancerosas también proliferan por la activación de receptores del factor de crecimiento, pero pierden el cuidadoso control de la proliferación normal. La pérdida de control puede deberse a numerosos factores, tales como la sobreexpresión de los factores de crecimiento y/o sus receptores, y la activación autónoma de las vías bioquímicas reguladas por los factores de crecimiento. Algunos ejemplos de RTK implicados en la tumorigénesis son los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGFR), el factor de crecimiento neural (NGFR) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). La unión de estos factores de crecimiento por sus receptores de la superficie celular induce la activación de los receptores, que inicia y modifica las vías de transducción de la señal y conduce a la proliferación y diferenciación celular.

20 Los miembros de la familia de los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGF) son tirosina quinasas del receptor del factor de crecimiento particularmente importantes asociadas con la tumorigénesis de las células epidérmicas. El primer miembro de la familia de receptores de EGF que se descubrió fue el EGFR, que se expresa en muchos tipos de células tumorales. Se ha descubierto que el EGFR está implicado en la regulación de la división y el crecimiento de las células tumorales, así como la reparación y supervivencia, la angiogénesis, la invasión y la metástasis tumoral.

25 El EGFR es una glicoproteína que atraviesa la membrana de 170 kD con un dominio extracelular de unión al ligando, una región transmembrana y un dominio de la proteína tirosina quinasa en el citoplasma. Ejemplos de ligandos que estimulan el EGFR incluyen el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor α de crecimiento transformante (TGF α), el factor de crecimiento de unión a la heparina (HBGF), la celulina- β y cripto-1. La unión de ligandos específicos tiene como resultado la autofosforilación del EGFR, la autofosforilación, la activación del dominio tirosina quinasa citoplasmático del receptor y el inicio de múltiples vías de transducción de señal que regulan el crecimiento y la supervivencia tumoral. La vía del EGFR también influye sobre la producción de otros diversos factores angiogénicos, tales como el VEGF y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), en los tumores.

30 También se piensa que los factores de crecimiento que activan el EGFR desempeñan un papel en la angiogénesis tumoral. Se sabe que la angiogénesis, que hace referencia a la formación de capilares a partir de vasos preexistentes en el embrión y el organismo adulto, es un elemento clave en el crecimiento, supervivencia y metástasis tumoral. Se ha comunicado que la estimulación mediada por el EGFR de las células tumorales conduce al incremento de la expresión de los factores angiogénicos factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la interleucina 8 (IL-8) y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), que pueden conducir a la activación de las células endoteliales vasculares asociadas con el tumor. La estimulación de las células endoteliales vasculares asociadas con el tumor también se puede producir mediante la activación de sus propios receptores de EGF mediante factores de crecimiento producidos por el tumor, tales como RGF- α y EGF.

40 Se ha comunicado que muchos tumores humanos expresan o sobreexpresan EGFR. La expresión de EGFR se correlaciona con un pronóstico malo, disminución de la supervivencia y/o aumento de la metástasis. El EGFR, por esta implicación en la tumorigénesis, ha sido objeto específico de las terapias anticancerosas. Estas terapias han incluido principalmente un anticuerpo monoclonal que bloquea la unión del ligando al dominio extracelular del receptor o un inhibidor de la tirosina quinasa sintética que actúa directamente sobre la región intracelular para prevenir la transducción de señal.

45 Por ejemplo el AcMo cetuximab (ERBITLX®) es un anticuerpo monoclonal recombinante quimérico de ser humano/ratón que se une específicamente al dominio extracelular del EGFR humano. Cetuximab es un antagonista del EGFR que bloquea la unión al EGFR, previene la activación del receptor e inhibe el crecimiento de las células tumorales que expresan el EGFR. Se ha aprobado el uso de cetuximab en combinación con irinotecán o sin él en el tratamiento de pacientes con cáncer colorrectal metastásico que expresa el receptor del factor de crecimiento epidérmico que son resistentes o que no pueden tolerar la quimioterapia basada en irinotecán. También se ha demostrado que cetuximab es eficaz para el tratamiento de la psoriasis.

Sumario de la invención

- La presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos específicos del EGFR, preferentemente la región extracelular del EGFR, que comprenden seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) seleccionadas de la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 4, la SEC ID N° 6, la SEC ID N° 10, la SEC ID N° 12 y la SEC ID N°: 14.
- De acuerdo con la presente invención se proporciona un anticuerpo humano anti-EGFR aislado o fragmento de anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada de SEC ID N° 8 y/o la región variable de la cadena ligera de SEC ID N° 16. Dichos anticuerpos o fragmentos de los mismos de la presente invención tienen varias propiedades, que incluyen la capacidad para neutralizar el EGFR y prevenir la unión de un ligando del EGFR a su receptor.
- Preferentemente, el fragmento de anticuerpo se selecciona a partir de un anticuerpo de cadena sencilla, un Fab, un Fv de cadena sencilla, un diacuerpo, un triacuerpo, Fc, fragmentos bivalentes (Fab)₂ y un anticuerpo de un solo dominio. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo es un conjugado que comprende un agente antineoplásico, un resto diana o un resto indicador.
- Adicionalmente, la presente invención proporciona polinucleótidos aislados que codifican los presentes anticuerpos o fragmentos de los mismos, así como vectores de expresión que comprenden estas secuencias polinucleotídicas unidas operablemente a una secuencia de expresión. También se proporcionan células huésped recombinantes que comprenden el vector de expresión, o una progenie del mismo, en las que la célula expresa los presentes anticuerpos o fragmentos de los mismos. También se proporcionan procedimientos para producir anticuerpos o fragmentos de los mismos, que comprenden cultivar estas células en condiciones que permitan la expresión de los anticuerpos o fragmentos de los mismos. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden purificarse después a partir de la célula o el medio de la célula.
- Asimismo, se describen procedimientos de tratar el crecimiento tumoral en un mamífero, que comprenden administrar al mamífero una cantidad eficaz de un presente anticuerpo. Los presentes anticuerpos se pueden coadministrar con anticuerpos que se unen a otras RTK. Los procedimientos pueden también comprender administrar al mamífero un agente o tratamiento antineoplásico incluidos, por ejemplo, un agente quimioterapéutico y/o radiación. En ciertas realizaciones, se inhibe el crecimiento del tumor, en realizaciones preferidas, el tratamiento tiene como resultado la regresión del tumor.
- De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o un conjugado del mismo para usar como medicamento para inhibir el crecimiento tumoral en un mamífero.
- En concreto, el medicamento se puede usar para inhibir el crecimiento tumoral en un mamífero, en el que el tumor expresa EGFR, sobreexpresa EGFR, es un tumor primario, es un tumor metastático, es un tumor refractario, es un tumor vascularizado, o en el que el tumor se selecciona de un tumor colorrectal, un tumor de cabeza y cuello, un tumor pancreático, un tumor pulmonar, un tumor de mama, un carcinoma de células renales y un glioblastoma.
- Se describen procedimientos de tratar una enfermedad hiperproliferativa no cancerosa, por ejemplo psoriasis, en un mamífero, que comprenden administrar al mamífero una cantidad eficaz de un presente anticuerpo.
- Breve descripción de las figuras**
- Las Figuras 1A y 1B muestran los vectores de clonación para la expresión de los genes de inmunoglobulina, pDFC y pEE12.1L. La Figura 1C muestra el vector plasmídico pGS-11F8 que contiene el anticuerpo sencillo anti-EGFR humano completo.
- La Figura 2 muestra el perfil del digesto de restricción de pGS-11F8. Los marcadores de tamaño de ADN se indican en la escalera de ADN como pares de kilobases.
- La Figura 3 muestra la unión in-vitro de IMC-C11F8 e IMC-C225 al EGFR medida mediante ELISA.
- La Figura 4 muestra los resultados de la competición in-vitro de IMC-C11F8 e IMC-C225 con EGFR marcado con ¹²⁵I por la unión del EGFR.
- La Figura 5 muestra los efectos de IMC-C11F8 e IMC-C225 sobre la fosforilación del EGFR en las células BxPC3. El anticuerpo control usado es IMC-1C11.
- La Figura 6 muestra la inhibición de la fosforilación del EGFR por IMC-11F8 e IMC-C225as en las células A431.
- La Figura 7 muestra análisis Western Blot de la fosforilación del EGFR en presencia de células control sin estimular (carril 1), EGF (carril 2), IMC-C225 (carril 3), IMC-11F8 (carril 4) y anticuerpo control (carril 5). La Figura 5A muestra EGFR fosforilado usando un anticuerpo anti-fosfotirosina y la Figura 5B muestra el EGFR total en las células estimuladas.
- La Figura 8 muestra la inhibición de la fosforilación del EGFR estimulada por EGF mediante diversas concentraciones de

IMC-11F8. La Figura 7 muestra análisis Western Blot del anticuerpo anti-fosfotirosina del EGFR en células control sin estimular (carril 1), células estimuladas tratadas sin anticuerpo IMC-11F8 (carril 2), 15 µg/ml (carril 2), 3 µg/ml (carril 4) y 0,6 µg/ml (carril 2), de IMC-11F8. La Figura 8B muestra el EGFR total.

5 La Figura 9 muestra la inhibición de la proliferación de células DiFi mediante IMC-11F8, IMC-C225 y anticuerpos control, IMC-1C11 evaluado mediante un ensayo MTT.

La Figura 10 muestra la lisis específica de células DiFi marcadas con ⁵¹Cr tratadas con IMC-11F8 o IMC-C225 (ERBITUX™).

La Figura 11 muestra el crecimiento de células tumorales A431 en ratones tratados con IMC-11F8 o IMC-C225 (Cetuximab). Los animales sin tratar sirvieron como controles del crecimiento tumoral.

10 La Figura 12 muestra el crecimiento de células tumorales BxPC3 en ratones tratados con IMC-11F8 o IMC-C225 (Cetuximab). Los animales sin tratar sirvieron como controles del crecimiento tumoral.

15 La Figura 13 muestra la tinción inmunohistoquímica de tumores humanos xenoinjertados procedentes de ratones atímicos tratados con solución salina o con IMC-11F8. Paneles A y B, xenoinjertos A431 de ratones atímicos tratados con solución salina (A) o con IMC-11F8 (B). Paneles C y D, xenoinjertos BxPC3 de ratones atímicos tratados con solución salina (C) o con IMC-11F8 (D). Paneles E y F, tinción con Ki-67 de xenoinjertos A431 de ratones atímicos tratados con solución salina (E) o con IMC-11F8 (F).

20 La Figura 14 muestra inhibición de carcinomas colorrectales humanos xenoinjertados en ratones atímicos por IMC-11F8 en combinación con Cut-11. Ratones atímicos portadores de xenoinjertos de tumor colorrectal humano GEO (panel A), DLD-1 (panel B) o HT-29 (panel C), tratados con inyección intraperitoneal de solución salina o IMC-11F8 dos veces a la semana a 0,3 mg o 1,0 mg/inyección, solo o en combinación con CPT-11 a la dosis de 100 mg/kg una vez a la semana. Los tamaños de los tumores se midieron dos veces a la semana. Los datos representa la media ± SE de las medidas de los tumores de 10 animales en cada grupo. (D) Regresión tumoral tras el tratamiento con IMC-11F8 solo o en combinación con CPT-11. Cada grupo de tratamiento está constituido por 10 animales portadores de tumor.

Descripción detallada de la invención

25 La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos tal como se define en las reivindicaciones que son específicos del EGFR, así como secuencias de polinucleótidos aislados o purificados que codifican los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención son, preferentemente, humanos y se pueden usar para tratar enfermedades neoplásicas, incluidos tumores sólidos y no sólidos, y para el tratamiento de trastornos hiperproliferativos.

30 Los anticuerpos de la presente invención son, preferentemente, humanos y se pueden usar para tratar enfermedades neoplásicas, incluidos tumores sólidos y no sólidos, y para el tratamiento de trastornos hiperproliferativos. Las cadenas individuales pueden plegarse en dominios que tienen tamaños (110-125 aminoácidos) y estructuras similares, pero diferentes funciones. La cadena ligera puede comprender un dominio variable (VL) y/o un dominio constante (CL). La cadena pesada puede también comprender un dominio variable (VH) y/o, en función de la clase o el isotipo de anticuerpo, tres o cuatro dominios constantes (CH1, CH2, CH3 y CH4). En seres humanos, los isotipos son IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y la IgA y la IgG además se dividen en subclases o subtipos (IgA₁₋₂ e IgG₁₋₄).

40 En general, los dominios variables muestran una considerable variabilidad de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo al otro, en particular en la localización del sitio de unión al antígeno. Tres regiones, denominadas regiones hipervariables o determinantes de la complementariedad (CDR), se encuentran en cada VL y VH, soportadas por regiones menos variables denominadas regiones variables de la estructura.

45 La porción de un anticuerpo constituida por los dominios VL y VH se denomina Fv (fragmento variable) y constituye el sitio de unión al antígeno. La Fv de una cadena (scFv) es un fragmento de anticuerpo que contiene un dominio VL y un dominio VH en una cadena polipeptídica, en la que el extremo N de un dominio y el extremo C del otro dominio están unidos por un ligador flexible (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4,946,778 (Ladner y col.); el documento WO 88/09344, (Huston y col.). El documento WO 92/01047 (McCafferty y col.) describe la expresión de los fragmentos scFv sobre la superficie de paquetes de expresión genética recombinantes solubles, tales como bacteriófagos.

50 Los ligadores peptídicos usados para producir los anticuerpos de cadena sencilla pueden ser péptidos flexibles seleccionados para garantizar que se produce el plegamiento tridimensional adecuado de los dominios de VL y VH. En general, el ligador tiene de 10 a 50 residuos aminoácidos. Preferentemente, el ligador tiene de 10 a 30 residuos aminoácidos. Más preferentemente, el ligador tiene de 12 a 30 residuos aminoácidos. Más preferentemente es un ligador de 15 a 25 residuos aminoácidos. Un ejemplo de dichos péptidos ligadores incluye (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ (SEC ID N° 19).

Los anticuerpos de cadena sencilla carecen de parte o de todos los dominios constantes de todos los anticuerpos a partir de los cuales derivan. Por tanto, se pueden superar algunos de los problemas asociados con el uso de anticuerpos

5 enteros. Por ejemplo, los anticuerpos de cadena sencilla tienen a carecer de determinadas interacciones indeseadas entre las regiones constantes de las cadenas pesadas y otras moléculas biológicas. Adicionalmente, los anticuerpos de cadena sencilla son considerablemente más pequeños que los anticuerpos enteros y pueden tener una permeabilidad mayor que los anticuerpos enteros, lo que permite que los anticuerpos de cadena sencilla se localicen y se unan a los sitios de unión al antígeno diana con mayor eficacia. Además, el tamaño relativamente pequeña de los anticuerpos de cadena sencilla hace que sea menos probable que provoquen en un receptor una respuesta inmunitaria indeseada que los anticuerpos enteros.

10 Los anticuerpos de múltiples cadenas en los que cada cadena tiene un dominio V_H y uno V_L unidos covalentemente por un primer ligador peptídico pueden estar unidos covalentemente por al menos uno o más ligadores peptídicos para formar anticuerpos de una cadena multivalentes, que pueden ser mono-específicos o multi-específicos. Cada cadena de un anticuerpo de una cadena multivalente incluye un fragmento de la región variable de la cadena ligera y un fragmento de la región variable de la cadena pesada, y está unido por un ligador peptídico a al menos otra cadena. El ligador peptídico está compuesto por al menos quince residuos de aminoácidos. El número máximo de residuos de aminoácidos es de aproximadamente cien.

15 Dos anticuerpos de cadena sencilla se pueden combinar para formar un dímero, también conocido como dímero bivalente. Los dímeros tienen dos cadenas y dos sitios de unión, y pueden ser mono-específicos o bio-específicos. Cada cadena del dímero incluye un dominio V_H conectado a un dominio V_L . Los dominios están conectados con ligadores lo bastante cortos para prevenir el emparejamiento entre los dominios en la misma cadena, de modo que se fuerza el emparejamiento a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno.

20 Tres anticuerpos de cadena sencilla se pueden combinar para formar trímeros, también conocidos como trímeros trivalentes. Los trímeros se construyen con el extremo aminoácido de un dominio V_L o V_H directamente condensado al extremo carboxilo de un dominio V_L o V_H , es decir sin ninguna secuencia ligadora. El trímero tiene tres cabezas F_v con los polipéptidos dispuestos de un modo cíclico y de cabeza a cola. Una conformación posible del trímero es planar con los tres sitios de unión localizados en un plano en un ángulo de 120 grados uno de otro. Los trímeros pueden ser mono-específicos, bio-específicos o tri-específicos.

25 Fab (fragmento de unión a antígeno) se refiere a los fragmentos del anticuerpo constituidos por los dominios V_L , C_L , V_H y C_H1 . Los generados tras la digestión con papaína simplemente se denominan Fab y no conservan la región bisagra de la cadena pesada. Tras la digestión con pepsina se generan varios Fab que conservan la región bisagra de la cadena pesada. Los fragmentos divalentes con los puentes disulfuro intercatenarios intactos se denominan $F(ab')_2$, aunque un Fab' monovalente es el resultado cuando no se retienen los puentes disulfuro. Los fragmentos $F(ab')_2$ tienen una avididad mayor por el antígeno que los fragmentos Fab monovalentes.

30 El Fc (fragmento de cristalización) es la designación de la porción o fragmento de un anticuerpo que comprende los dominios constantes de la cadena pesada emparejados. En un anticuerpo IgG, por ejemplo, el Fc comprende los dominios C_{H2} y C_{H3} . La Fc de un anticuerpo IgA o IgM comprende además un dominio C_{H4} . El Fc está asociado con la unión al receptor de Fc, la activación de la citotoxicidad mediada por complemento y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Para anticuerpos tales como IgA e IgM, que son complejos de múltiples proteínas similares a IgG, la formación de complejos requiere los dominios constantes de Fc.

35 Por último, la región bisagra separa las porciones Fab y Fc del anticuerpo, lo que proporciona movilidad de los Fab uno respecto de otro y respecto al Fc, además de incluir múltiples puentes disulfuro para el enlace covalente de las dos cadenas pesadas.

40 Por tanto, los anticuerpos de la invención incluyen, entre otros, anticuerpos naturales, fragmentos bivalentes tales como $(Fab')_2$, fragmentos monovalentes tales como Fab, anticuerpos de una cadena, F_v de una cadena (scFv), anticuerpos de un solo dominio, anticuerpos multivalentes de una cadena, dímeros y trímeros, que se unen específicamente a los antígenos.

45 Los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, de la presente invención son específicos de EGFR. La especificidad del anticuerpo se refiere al reconocimiento selectivo del anticuerpo para un epítipo concreto de un antígeno. Los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, por ejemplo, pueden ser mono-específicos o bio-específicos. Los anticuerpos bio-específicos (BsAb) son anticuerpos que tienen dos especificidades o sitios de unión a antígenos diferentes. Cuando un anticuerpo tiene más de una especificidad, los epítipos reconocidos se pueden asociar con un solo antígeno o con más de un antígeno. Por tanto, se describen anticuerpos bio-específicos, o fragmentos de los mismos, que se unen a dos antígenos diferentes, con al menos una especificidad por el EGFR.

50 La especificidad de los presentes anticuerpos, o fragmentos de los mismos, por el EGFR se puede determinar en base a la afinidad y/o la avididad. La afinidad, representada por la constante de equilibrio, por la disociación de un antígeno con un anticuerpo (Kd), mide la fuerza de la unión entre un determinante antigénico y un sitio de unión al anticuerpo. La avididad es

la medida de la fuerza de la unión entre un anticuerpo y su antígeno. La avidéz está relacionada con la afinidad entre un epítipo con su sitio de unión a antígeno en el anticuerpo y la valencia del anticuerpo, que hace referencia al número de sitios de unión al antígeno de un epítipo concreto. Los anticuerpos normalmente se unen con una constante de disociación (K_d) de 10^{-5} a 10^{-11} litros/mol. Cualquier K_d inferior a 10^{-4} litros/mol generalmente se considera que indica unión inespecífica. Cuando menor es el valor de la K_d , mayor es la fuerza de la unión entre un determinante antigénico y el sitio de unión del anticuerpo.

Como se usa en el presente documento, "anticuerpos" y "fragmentos de anticuerpo" incluye modificaciones que conservan la especificidad por el receptor de EGF. Dichas modificaciones incluyen, entre otros, la conjugación a una molécula efectora tal como un agente quimioterapéutico (p. ej., cisplatino, taxol, doxorubicina) o citotoxina (p. ej., una proteína, un agente quimioterapéutico orgánico O proteico). Los anticuerpos se pueden modificar mediante conjugación con restos indicadores detectables. También se incluyen anticuerpos con alteraciones que afectan a las características de no unión, tales como la semivida (p. ej., pegilación).

Las proteínas y los agentes no proteicos pueden estar conjugadas a los anticuerpos mediante procedimientos conocidos en la técnica. Los procedimientos de conjugación incluyen unión directa, unión mediante ligadores unidos covalentemente y miembros de pares de unión específica (p. ej., avidina-biotina). Dichos procedimientos incluyen, por ejemplo, el descrito por Greenfield y col., *Cancer Research* 50, 6600-6607 (1990) para la conjugación de doxorubicina y los descritos por Arnon y col., *Adv. Exp. Med. Biol.* 303, 79-90 (1991) y por Kiseleva y col., *Mol. Biol. (USSR)* 25, 508-514 (1991) para la conjugación de compuestos de platino.

Equivalentes de los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, también incluyen polipéptidos con secuencias de aminoácidos sustancialmente iguales a la secuencia de aminoácidos de las regiones variables o hipervariables de los anticuerpos anti-EGFR de longitud completa divulgados en el presente documento. Una secuencia de aminoácidos sustancialmente igual se define en el presente documento como una secuencia con al menos aproximadamente 70 %, preferentemente al menos aproximadamente 80 % y más preferentemente al menos aproximadamente 90 % de homología, determinado mediante el procedimiento de búsqueda FASTA de acuerdo con Pearson y Lipman (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2444-8 (1988)), incluidas las secuencias que son idénticas en al menos aproximadamente 70 %, preferentemente al menos aproximadamente 80 % y más preferentemente al menos aproximadamente 90 %.

Dichos antibióticos tendrán actividades de unión, bloqueo de unión y de neutralización del receptor iguales o similares a las de los anticuerpos de la invención, que comprenden las SEC ID N° 8 y 16, particularmente cuando son sustituciones conservadoras de aminoácidos. Una sustitución conservadora de aminoácidos se define como un cambio en la composición de los aminoácidos cambiando uno o más aminoácidos de un péptido, polipéptido o proteína, o fragmento de los mismos. La sustitución es de aminoácidos con propiedades generalmente similares (p. ej., ácidos, básicos, aromáticos, de tamaño, de carga positiva o negativa, con polaridad, sin polaridad) de modo que las sustituciones no alteran sustancialmente las características relevantes del péptido, polipéptido o proteína (p. ej., la carga, el punto isoeléctrico, la afinidad, la avidéz, la conformación, la solubilidad) o la actividad. Sustituciones conservadoras típicas se seleccionan en los grupos de aminoácidos, en los que los grupos incluyen, entre otros:

- (1) hidrófobos: metionina (M), alanina (A), valina (V), leucina (L), isoleucina (I);
- (2) hidrófilos: cisteína (C), serina (S), treonina (T), asparagina (N), glutamina (Q);
- (3) ácidos: ácido aspártico (D), ácido glutámico (E);
- (4) básicos: histidina (H), lisina (K), arginina (R);
- (5) aromáticos: fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W);
- (6) residuos que influyen en la orientación de las cadenas: gly, pro

Los anticuerpos de la presente divulgación incluyen además aquéllos para los que las características de unión se han mejorado mediante mutación directa, procedimientos de maduración de la afinidad, expresión e fagos o reordenamiento de cadenas. La afinidad y la especificidad se pueden mejorar o modificar a través de mutaciones de CDR y detección selectiva de sitios de unión a antígeno que tienen las características deseadas (véase, por ejemplo, Yang y col., *J. Mol. Biol.*, 254:: 392-403 (1995)). Las CDR se mutan de diversos modos. Un modo es aleatorizar los residuos individuales o combinaciones de residuos de modo que, e una población de, por otro lado, sitios de unión a antígeno idénticos, los veinte aminoácidos se encuentran en posiciones concretas. Como alternativas, las mutaciones se inducen en una amplia gama de residuos de CDR mediante procedimientos de PCR de tendencia a error (véase, por ejemplo, Hawkins et al., *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992)). Por ejemplo, los vectores de expresión en fagos que contienen genes de la región variable de la cadena pesada y ligera se pueden propagar en las cepas mutadoras de *E. coli* (véase, por ejemplo, Low y col., *J. Mol. Biol.*, 250: 359-368 (1996)). Estos procedimientos de mutagénesis son ilustrativos de los muchos procedimientos conocidos por el experto en la técnica.

5 Cada dominio de los anticuerpos de la presente invención puede ser un dominio completo de inmunoglobulina (p. ej., un dominio constante o variable de la cadena pesada o ligera) o puede ser un equivalente funcional o un mutante o derivado de un dominio natural o un dominio sintético construido, por ejemplo, in Vitro usando una técnica tal como una descrita en el documento WO 93/11236 (Griffiths y col.). Por ejemplo, es posible unir los dominios correspondientes a los dominios variables del anticuerpo, que carecen de al menos un aminoácido. El rasgo característico importante de los anticuerpos es la presencia de un sitio de unión a antígeno. No deben interpretarse que los términos fragmento variable de cadena pesada y de cadena ligera excluyen las variantes que no tienen un efecto material sobre la especificidad.

10 Los anticuerpos de la presente divulgación, o fragmentos de los mismos, son anticuerpos humanos que tienen uno, dos, tres, cuatro, cinco y/o seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) seleccionadas del grupo constituido por las SEC ID N° 2, SEC ID N° 4, SEC ID N° 6, SEC ID N° 10, SEC ID N° 12 y SEC ID N° 14. Los anticuerpos (o fragmentos de los mismos) de la presente invención tienen CDR de SEC ID N° 2, SEC ID N° 4 y SEC ID N° 6 y CDR de SEC ID N° 10, SEC ID N° 12 y SEC ID N° 14. Las secuencias de aminoácidos de las CDR se indican a continuación en la Tabla 1.

TABLA 1

<u>Cadena pesada</u>		
CDR1	SGDYYWS	SEQ ID NO:2
CDR2	YIYYSGSTDYNPSLKS	SEQ ID NO:4
CDR3	VSIFGVGTFDY	SEQ ID NO:6
<u>Cadena ligera</u>		
CDR1	RASQSVSSYLA	SEQ ID NO:10
CDR2	DASNRAT	SEQ ID NO:12
CDR3	HQYGSTPLT	SEQ ID NO:14

15 Los presentes anticuerpos, o fragmentos de los mismos, tienen una región variable de la cadena pesada de SEC ID N° 8 y una región variable de la cadena ligera de SEC ID N° 16. El IMC-11F8 es un anticuerpo particularmente preferido de la presente invención. Este anticuerpo tiene regiones estructurales de V_H y V_L (FW) además de CDR. El dominio variable V_H de IMC-11F8 (SEC ID N° 8) tiene tres CDR (SEC ID N° 2, 4 y 6) y cuatro FW, y el dominio V_L (SEC ID N° 16) tiene tres CDR (SEC ID N° 10, 12 y 14) y cuatro FW.

20 Preferentemente, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, de la presente invención neutralizan el EGFR. La unión de un ligando, por ejemplo EGF o TGF- α , a un dominio extracelular externo de EGFR estimula la dimerización del receptor, la autofosforilación de EGFR, la activación del dominio citoplasmático interno de la tirosina quinasa y el inicio de múltiples vías de transactivación y transducción de la señal implicadas en la regulación de la síntesis del ADN (activación génica) y la progresión del ciclo celular o la división. También preferentemente, los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, de la presente invención son específicos de la región extracelular del EGFR. Los presentes anticuerpos, o fragmentos de los mismos, además previenen, preferentemente, la unión de un ligando del EGFR a su receptor. En esta realización, los anticuerpos de la presente invención, o fragmentos de los mismos, se unen al EGFR con al menos la misma fuerza que los ligandos naturales del EGFR (EGF y TGF- α).

25 La neutralización del EGFR incluye la inhibición, disminución, inactivación y/o alteración de una o más de estas actividades, normalmente asociadas con la transducción de señal. Por tanto, la neutralización del EGFR tiene varios efectos, incluidos inhibición, disminución, inactivación y/o alteración del crecimiento (proliferación y diferenciación), angiogénesis (reclutamiento de los vasos sanguíneos, invasión y metástasis) y motilidad celular y metástasis (adhesión y capacidad de invasión de las células).

30 Una medida de la neutralización del EGFR es la inhibición de la actividad tirosina quinasa del receptor. La inhibición de la

actividad tirosina quinasa se puede determinar usando procedimientos bien conocidos; por ejemplo midiendo el nivel de autofosforilación del receptor de la quinasa recombinante y/o la fosforilación de sustratos naturales o sintéticos. Por tanto, los ensayos de fosforilación son útiles en la determinación de anticuerpos neutralizantes en el contexto de la presente invención. La fosforilación se puede detectar usando, por ejemplo, un anticuerpo específico de la fosfotirosina en un ensayo ELISA o en un western blot. Algunos ensayos para la actividad tirosina quinasa se describen en Panek y col., J. Pharmacol. Exp. Thera. 283: 1433-44 (1997) y Batley y col., Life Sci. 62: 143-50 (1998).

Además, se pueden usar procedimientos para la detección de la expresión de proteínas para determinar la neutralización del EGFR, en los que las proteínas o actividades proteicas o estados de activación que se están midiendo están regulados por la actividad tirosina quinasa de la EGFR. Estos procedimientos incluyen inmunohistoquímica (IHQ) para la detección de la expresión de proteínas, hibridación con fluorescencia in situ (FISH) para la detección de la amplificación génica, ensayos de unión competitiva con radioligando, técnicas de transferencia en matriz sólida, tales como transferencias Northern y Southern, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) y ELISA. Véase, por ejemplo, Grandis y col., Cancer, 78:1284-92 (1996); Shimizu y col., Japan J. Cancer Res., 85:567-71(1994); Sauter y col., Am. J. Path., 148:1047-53 (1996); Collins, Glia, 15:289-96 (1995); Radinsky y col., Clin. Cancer Res., 1:19-31 (1995); Petrides y col., Cancer Res., 50:3934-39 (1990); Hoffmann y col., Anticancer Res., 17:4419-26 (1997); Wikstrand y col., Cancer Res., 55:3140-48 (1995).

También se pueden usar ensayos *in vivo* para determinar la neutralización del EGFR. Por ejemplo, mediante ensayos con mitógenos se puede observar inhibición de la tirosina quinasa del receptor usando líneas celulares estimuladas con el ligando del receptor en presencia y ausencia de inhibidor. Por ejemplo, se pueden usar células A431cells (Colección Americana de cultivos Tipo (ATCC), Rockville, MD) estimuladas con EGF para investigar la inhibición del EGFR. Otro procedimiento implica analizar la inhibición del crecimiento de células tumorales que expresan EGFR usando, por ejemplo, células tumorales humanas inyectadas en un ratón. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 6.365.157 (Rockwell y col.).

La presente invención no está limitada por ningún mecanismo concreto de neutralización del EGFR. Los anticuerpos anti-EGFR de la presente invención se pueden unir externamente al receptor del EGF de la superficie celular, bloquear la unión del ligando (p. ej., EGF o TGF- α) y la posterior transducción de la señal medida por la tirosina quinasa asociada al receptor y prevenir la fosforilación del EGFR y otras proteínas cadena abajo en la cascada de la transducción de señal. El complejo anticuerpo-receptor también se puede internalizar y degradar, lo que tiene como resultado la regulación por disminución del receptor de la superficie celular. Las metaloproteinasas de la matriz, que funcionan en la invasión y metástasis de las células tumorales también se puede regular por disminución mediante los anticuerpos de la presente invención. Además, los anticuerpos de la presente invención pueden exhibir inhibición de la producción del factor de crecimiento y la angiogénesis.

Los fragmentos de anticuerpo se pueden producir escindiendo un anticuerpo entero o expresando ADN que codifica el fragmento. Los fragmentos de anticuerpos se pueden preparar mediante procedimientos descritos por Lamoyi y col., J. Immunol. Methods, 56:235-243 (1983) y por Parham, J. Immunol. 131: 2895-2902 (1983). Dichos fragmentos pueden contener uno o ambos fragmentos Fab o el fragmento F(ab')₂. Dichos fragmentos pueden también contener anticuerpos con la región variable del fragmento de una cadena, es decir scFv, diacuerpos u otros fragmentos de anticuerpo. Los procedimientos de producir dichos equivalentes funcionales se divulgan en la solicitud de PCT WO 93/21319, la solicitud de patente europea n° EP 239400; la solicitud de PCT WO 89/09622; la solicitud de patente europea n° EP 338745; y la solicitud de patente europea EP 332424.

Células huésped preferidas para la transformación de vectores y expresión de los antagonistas de receptores de la presente invención son células de mamífero, por ejemplo células COS-7, células de ovario de hámster chino (CHO) y líneas celulares de origen linfoide tales como linfoma, mieloma (p. ej., NS0) o células de hibridoma. Como alternativa se pueden usar otros huéspedes eucarióticos, tales como levaduras.

Cuando se desee expresar una construcción génica en levaduras, un gen de selección adecuado para usar en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levaduras YRp7. Stinchcomb y col. Nature, 282: 39 (1979); Kingsman y col., Gene, 7: 141 (1979). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levaduras que carece de la capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N° 44076 o PEP4-1. Jones, Genetics, 85: 12 (1977). La presencia de daños en *trp1* en el genoma de la célula huésped levadura proporciona un ambiente eficaz para detectar transformación mediante crecimiento en ausencia de triptófano. De forma similar, las cepas de levaduras deficientes en *Leu2* (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan con plásmidos conocidos portadores del gen *Leu2*.

Las células huésped transformadas se cultivan mediante procedimientos conocidos en la técnica en un medio líquido que contiene fuentes asimilables de carbono (hidratos de carbono, tales como glucosa o lactosa), nitrógeno (aminoácidos, péptidos, proteínas o sus productos de degradación tales como peptonas, sales de amonio o similares) y sales inorgánicas (sulfatos, fosfatos y/o carbonatos de sodio, potasio, magnesio y calcio). El medio contiene además, por ejemplo, sustancias de estimulación del crecimiento, tales como oligoelementos, por ejemplo hierro, cinc, manganeso y similares.

5 Como se describe en los ejemplos siguientes, se pueden aislar anticuerpos anti-EGFR de alta afinidad de acuerdo con la presente invención a partir de una biblioteca de expresión en fagos de los genes d e las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera humanas. Por ejemplo, se puede obtener un dominio variable de la invención a partir de un linfocito de sangre periférica que contiene un gen reordenado de la región variable. Como alternativa se pueden obtener porciones del dominio variable, tales como regiones CDR y FW, de diferentes secuencias humanas. Más del 90 % de los clones recuperados tras tres ciclos de selección son específicos del EGFR. Las afinidades de unión por el EGFR de las Fab sometidas a detección selectiva se encuentran en el intervalo de nM, que son tan altas como las de varios anticuerpos monoclonales bivalentes anti-EGFR producidos usando la tecnología del hibridoma.

10 Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la presente invención se pueden obtener, por ejemplo, de anticuerpos naturales o de bibliotecas de expresión en fagos de Fac o scFv. Se entiende que, para fabricar un anticuerpo de dominio único a partir de un anticuerpo que comprende un dominio V_H y uno V_L , se puede desear ciertas sustituciones de aminoácidos fuera de las CDR para potenciar la unión, la expresión o la solubilidad. Por ejemplo, puede ser deseable modificar residuos de aminoácidos que, de otro modo, estarían enterrados en la interfaz V_H-V_L .

15 Además, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos de la presente invención se pueden obtener mediante tecnología de hibridoma estándar (Harlow & Lane, ed., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 211-213 (1998) usando ratones transgénicos (p. ej., ratones KM de Medarex, San Jose, Calif.) que producen las cadenas ligera kappa y pesada gamma de inmunoglobulina humana. En una realización preferida, una porción sustancial del genoma productor del anticuerpo humano se inserta en el genoma del ratón y se convierte en deficiente en la producción de anticuerpos murinos endógenos. Dichos ratones pueden inmunizarse por vía subcutánea (s.c.) con KDR (VEGFR-2) en adyuvante completo de Freund.

20 La proteína usada para identificar los anticuerpos de unión a EGFR de la invención es, preferentemente, EGFR, y, más preferentemente, es el dominio extracelular de EGFR. El dominio extracelular de EGFR puede estar libre o conjugado con otra molécula.

25 La presente invención también proporciona polinucleótidos aislados que codifican los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, descritos anteriormente. La invención incluye ácidos nucleicos que tienen una secuencia que codifica las seis CDR. En la Tabla 2 se exponen las secuencias de ácido nucleico.

TABLA 2

Cadena pesada	
CDR1 agtgggtgatt actactggag t	SEC ID Nº 1
CDR2 tacatctatt acagtgggag caccgactac aacccgtccc tcaagagt	SEC ID Nº 3
CDR3 gtgtcgattt ttggagtggg gacatttga ctac	SEC ID Nº 5
Cadena ligera	
CDR1 agggccagtc agagtgttag cagctactta gcc	SEC ID Nº 9
CDR2 gatgcatcca acaggccac t	SEC ID Nº 11
CDR3 caccagtatg gtagcacacc tctcact	SEC ID Nº 13

30 Se puede prepara ADN que codifica anticuerpos humanos mediante recombinación de ADN que codifica las regiones constantes y las regiones variables humanas, aparte de las CDR, derivadas sustancialmente o exclusivamente de las regiones de anticuerpo humano correspondientes y ADN que codifica las CDR derivadas de ser humano (SEC ID Nº 1, 3 y 5 para las CDR del dominio variable de la cadena pesada y las SEC ID Nº 9, 11 y 14 de las CDR del dominio variable de la cadena ligera).

35 Fuentes adecuadas de ADN que codifican fragmentos de anticuerpos incluyen cualquier célula, tal como hibridomas y esplenocitos que expresan al anticuerpo de longitud completa. Los fragmentos se pueden usar por sí mismos como equivalentes de anticuerpos o se pueden recombinar en equivalentes, como se ha descrito anteriormente. Las deleciones y recombinaciones de ADN descritas en esta sección se pueden llevar a cabo mediante procedimientos conocidos, tales como los descritos en las publicaciones enumeradas anteriormente con respecto a los equivalentes de anticuerpos y/u otras técnicas de ADN recombinante estándar, como las que se describen más adelante. Otra fuente de ADN son anticuerpos de cadena sencilla producidos de una biblioteca de expresión en fagos, como se conoce en la técnica.

40

Adicionalmente, la presente invención proporciona vectores de expresión que contienen las secuencias polinucleotídicas descritas anteriormente unidas operablemente a una secuencia de expresión, un promotor y una secuencia potenciadora. Se han desarrollado varios vectores de expresión para la síntesis eficaz del polipéptido de anticuerpo en sistemas procariontes, tales como bacterias, y eucariotes, incluidos, entre otros, sistemas de cultivo celular en levaduras y mamíferos. Los vectores de la presente invención pueden comprender segmentos de secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético.

Se puede ser cualquier vector de expresión adecuado. Por ejemplo, los vectores de clonación procariontes incluyen plásmidos de *E. coli*, tales como *colE1*, *pCR1*, *pBR322*, *pMB9*, *pUC*, *pKSM* y *RP4*. Los vectores procariontes también incluyen derivados de ADN de fago, tales como *M13* y otros fagos de ADN monocatenario filamentosos. Un ejemplo de un vector útil en levaduras es el plásmido 2 μ . Vectores adecuados para la expresión en células de mamífero incluyen derivados bien conocidos de SV40, adenovirus, secuencias de ADN derivadas de retrovirus y vectores lanzadera derivadas de la combinación de vectores funcionales de mamífero, tales como los descritos anteriormente, y plásmidos funcionales y ADN de fago.

En la técnica se conocen otros vectores de expresión eucariota (p. ej., P.J. Southern y P. Berg, *J. Mol. Appl. Genet.*, 1, 327-341 (1982); Subramani y col., *Mol. Cell. Biol.*, 1: 854-864 (1981); Kaufmann y Sharp, "Amplification And Expression of Sequences Cotransfected with a Modular Dihydrofolate Reductase Complementary DNA Gene," *J. Mol. Biol.* 159, 601-621 (1982); Kaufmann y Sharp, *Mol. Cell. Biol.* 159, 601-664 (1982); Scahill y col., "Expression And Characterization Of The Product Of A Human Immune Interferon DNA Gene In Chinese Hamster Ovary Cells," *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 80, 4654-4659 (1983); Urlaub y Chasin, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 77 4216-4220, (1980).

Los vectores de expresión útiles en la presente invención contienen al menos una secuencia de control de la expresión que está unida operablemente a la secuencia de ADN o fragmento que se va a expresar. La secuencia control se inserta en el vector con el fin de controlar y regular la expresión de la secuencia de ADN clonado. Ejemplos de secuencias de control de la expresión útiles son el sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema *trc*, las principales regiones de operador y promotor del fago lambda, la región control de la proteína de cubierta fd, los promotores glicolíticos de levadura, por ejemplo el promotor de la 3-fosfoglicerato quinasa, los promotores de la fosfatasa ácida de levaduras, por ejemplo Pho5, los promotores de los factores de acoplamiento alfa de levaduras y los promotores derivados de polioma, adenovirus, retrovirus y virus de simio, por ejemplo los promotores tempranos y tardíos o SV40 y las otras secuencias de las que se sabe que controlan la expresión de genes de células procariontes y eucariotas y sus virus, o combinaciones de las mismas.

La presente invención también proporciona células huésped recombinantes que contienen los vectores de expresión como se han descrito anteriormente. Los anticuerpos de la presente invención se pueden expresar en líneas celulares distintas a los hibridomas. Se pueden usar ácidos nucleicos que comprenden una secuencia que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención, para la transformación de una célula huésped de mamífero adecuada.

Las líneas celulares de preferencia concreta se seleccionan en base al nivel de expresión elevado, la expresión constitutiva de la proteína de interés y la contaminación mínima de las proteínas huésped. En la técnica se conocen bien líneas de células de mamífero disponibles como huéspedes e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas, tales como, entre otras, células de ovario de cáncer chino (CHO), células de riñón de hámster neonato (BHK) y muchas otras. Células eucariotas adicionales adecuadas incluyen levaduras y otros hongos. Huéspedes procariontes útiles incluyen, por ejemplo, *E. coli*, tales como *E. coli* SG-936, *E. coli* HB 101, *E. coli* W3110, *E. coli* X1776, *E. coli* X2282, *E. coli* DHI y *E. coli* MRC1, *Pseudomonas*, *Bacillus*, tales como *Bacillus subtilis* y *Streptomyces*.

Estas células huésped recombinantes presentes se pueden usar para producir un anticuerpo, o fragmento del mismo, cultivando las células en condiciones que permiten la expresión del anticuerpo o fragmento del mismo y purificando el anticuerpo o fragmento del mismo de la célula huésped o del medio que rodea a la célula huésped. Dirigir el anticuerpo expresado o fragmento para la secreción en las células huésped recombinantes se puede facilitar insertando una secuencia que codifica una señal o péptido líder secretor (véase Shokri y col., *Appl Microbiol Biotechnol.* 60(6):654-64 (2003), Nielsen y col., *Prot. Eng.* 10:1-6 (1997) y von Heinje y col., *Nucl. Acids Res.* 14:4683-4690 (1986)) en el extremo 5' del gen de interés que codifica el anticuerpo. Estos elementos de péptido líder secretor pueden derivar de secuencias procariontes o eucariotas. De acuerdo con esto se usan adecuadamente péptidos líder secretores, siendo aminoácidos unidos al extremo N terminal de un polipéptido para dirigir el movimiento del polipéptido hacia fuera del citosol de la célula huésped y la secreción en el medio.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden condensar a residuos de aminoácidos adicionales. Dichos residuos de aminoácidos pueden ser una cola peptídica, quizá para facilitar el aislamiento. También se contemplan otros residuos de aminoácidos para dirigir los anticuerpos a órganos o tejidos específicos.

Se fabrica un anticuerpo de la presente invención expresando un ácido nucleico que codifica el anticuerpo en un animal transgénico, de modo que el anticuerpo se expresa y se puede recuperar. Por ejemplo, el anticuerpo se puede expresar de un modo específico de tejido que facilita la recuperación y purificación. Un anticuerpo de la invención se expresa en la

glándula mamaria para secreción durante la lactancia. Los animales transgénicos incluyen, entre otros, ratones, cabra y conejos.

5 Asimismo, se proporciona un procedimiento de tratar el crecimiento tumoral en un mamífero administrando al mamífero una cantidad eficaz de un anticuerpo como se ha descrito anteriormente. Tumores adecuados para tratar de acuerdo con la presente invención expresan, preferentemente, EGFR. Sin desear quedar ligado a ningún mecanismo concreto, las enfermedades y afecciones que se pueden tratar o prevenir mediante los presentes procedimientos incluyen, por ejemplo, aquéllos en los que se estimula el crecimiento tumoral o la angiogénesis patológica a través de un bucle paracrino y/ autocrino de EGFR. Es decir, los tumores que expresan EGFR son característicamente sensibles al EGF presente en su entorno y pueden además producir y ser estimulados por EGF y/o TGF- α en un bucle estimulador autocrino. El tratamiento de dichos tumores de acuerdo con la invención incluye la inhibición parcial o completa del crecimiento tumoral. 10 Notablemente, en ciertas realizaciones, la inhibición incluye además regresión tumoral.

15 Se observó expresión del EGFR en diversos tumores humanos, tanto *in vitro* como *in vivo*, y los niveles de expresión de EGFR varían ampliamente con el tipo de tumor. El EGFR se expresa a varios niveles sobre la superficie celular en un porcentaje significativo de tumores humanos, tales como carcinomas colorrectal, de cabeza y cuello (células escamosas), pancreático, pulmonar, de mama y de células renales, así como glioblastoma. En ciertos tipos de tumor, la expresión de EGFR es muy frecuente (p. ej., del 35 % al 70 % de los cánceres de ovario y aproximadamente el 25 % al 77 % de los cánceres colorrectales). Se pueden producir niveles altos de expresión de EGFR en correlación con la producción de ligandos del receptor (es decir, EGF y TGF- α). La expresión de EGFR también se ha correlacionado con una mayor resistencia a ciertos agentes quimioterapéuticos y a radioterapia. La expresión de EGFR también puede servir como factor 20 pronóstico en ciertos tipos de tumores, ya que se ha asociado con menor supervivencia, mal pronóstico y/o incremento del riesgo de metástasis. Además, existe mayor expresión de EGFR en múltiples tipos de tumores.

25 Los tumores que se van a tratar incluyen tumores primarios y tumores metastásicos, así como tumores refractarios. Los tumores refractarios incluyen tumores que no responden o son resistentes al tratamiento con agentes quimioterapéuticos solos, anticuerpos solos, radiación sola o combinaciones de los mismos. Los tumores refractarios también abarcan tumores que parecen ser inhibidos por el tratamiento con dichos agentes pero que recurren a los cinco años, en ocasiones hasta a los diez años, de la interrupción del tratamiento.

30 Los tumores que se pueden tratar con anticuerpos de la presente invención incluyen tumores que no están vascularizados, o todavía no sustancialmente vascularizados, así como tumores vascularizados. Ejemplos de tumores sólidos que se pueden tratar en consecuencia incluyen el carcinoma de mama, el carcinoma de pulmón, el carcinoma colorrectal, el carcinoma pancreático, el glioma y el linfoma. Algunos ejemplos de dichos tumores incluyen tumores epidermoides, tumores escamosos, tales como tumores de cabeza y cuello, tumores colorrectales, tumores de próstata, tumores de mama, tumores pulmonares, incluyendo tumores pulmonares microcíticos y amicrocíticos, tumores pancreáticos, tumores de tiroides, tumores de ovarios y tumores hepáticos. Otros ejemplos incluyen el sarcoma de Kaposi, neoplasias del SNC, neuroblastomas, hemangioblastomas capilares, meningiomas y metástasis cerebrales, melanoma, 35 carcinomas y sarcomas gastrointestinales y renales, rhabdomyosarcoma, glioblastoma, preferentemente glioblastoma multiforme, y leiomyosarcoma.

40 En otro aspecto de la invención, los anticuerpos anti-EGFR inhiben la angiogénesis asociada con el tumor. La estimulación del EGFR del endotelio vascular está asociada con la vascularización de tumores. Normalmente, el endotelio vascular se estimula de un modo paracrino mediante, por ejemplo EGF y/o TGF- α de otras fuentes (p. ej., células tumorales).

45 De acuerdo con esto, los anticuerpos anti-EGFR son eficaces para tratar sujetos con tumores vascularizados o neoplasias o enfermedades angiogénicas. Dichos tumores y neoplasias incluyen, por ejemplo tumores malignos y neoplasias, tales como blastomas, carcinomas o sarcomas, y tumores y neoplasias altamente vasculares. Los cánceres que se pueden tratar mediante los procedimientos de la presente divulgación incluyen, por ejemplo, cánceres de cerebro, de tracto genitourinario, de sistema linfático, de estómago, renal, de colon, de laringe y de pulmones y de hueso. Ejemplos no limitantes incluyen además tumores epidermoides, tumores escamosos, tales como tumores de cabeza y cuello, tumores colorrectales, tumores de próstata, tumores de mama, tumores pulmonares, incluyendo adenocarcinoma pulmonar y tumores pulmonares microcíticos y amicrocíticos, tumores pancreáticos, tumores de tiroides, tumores de ovarios y tumores hepáticos. El procedimiento también se usa para el tratamiento de cánceres de piel vascularizados, incluidos carcinoma de 50 células escamosas, carcinoma de células basales y cánceres de piel que se pueden tratar mediante la supresión del crecimiento de los queratinocitos, tales como queratinocitos malignos humanos. Otros cánceres que se pueden tratar incluyen sarcoma de Kaposi, neoplasias del SNC (neuroblastomas, hemangioblastomas capilares, meningiomas y metástasis cerebrales), melanoma, carcinomas y sarcomas gastrointestinales y renales, rhabdomyosarcoma, glioblastoma, incluidos glioblastoma multiforme, y leiomyosarcoma.

55 La presente divulgación también proporciona un procedimiento de tratar una enfermedad hiperproliferativa no cancerosa en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz del anticuerpo de la presente invención. Como se divulga en el presente documento, "enfermedad hiperproliferativa" se define como una afección producida por un

crecimiento excesivo de células no cancerosas que expresan un miembro de la familia de receptores del EGFR. El exceso de células generado por una enfermedad hiperproliferativa expresan EGFR a niveles normales o pueden sobreexpresar EGFR.

5 Los tipos de enfermedades hiperproliferativas que se pueden tratar de acuerdo con la invención son cualquier enfermedad hiperproliferativa que se estimula mediante un ligando de EGFR o mutantes de dichos ligandos. Ejemplos de enfermedades hiperproliferativas incluyen psoriasis, queratosis acróica y queratosis seborreica, verrugas, cicatrices queloides y eccema. También se incluyen enfermedades hiperproliferativas causadas por infecciones víricas, tales como la infección por el virus del papiloma. Por ejemplo, la psoriasis aparece con muchas variaciones y grados de gravedad diferentes. Diferentes tipos de psoriasis muestran características tales como ampollas similares al pus (psoriasis pustular), 10 intensa descamación de la piel (psoriasis eritrodérmica), puntos similares a gota (psoriasis en gotas) y lesiones lisas inflamadas (psoriasis inversa). Se describe el tratamiento de todos los tipos de psoriasis (psoriasis vulgar, psoriasis pustulosa, psoriasis eritrodérmica, psoriasis artropática, parapsoriasis, pustulosis palmoplantar).

15 En los procedimientos de la presente divulgación se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención a un mamífero que lo necesite. El término administrar, como se usa en el presente documento, significa liberar los anticuerpos de la presente invención en un mamífero mediante cualquier procedimiento que puede conseguir el resultado buscado. Se pueden administrar, por ejemplo, por vía intravenosa o intramuscular. Aunque los anticuerpos humanos de la invención son particularmente útiles para la administración a seres humanos, también se pueden administrar a otros mamíferos. Con el término mamífero, como se usa en el presente documento, se pretende incluir, entre otros, seres humanos, animales de laboratorio, mascotas y animales de granja. Cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de anticuerpo de la presente invención que, cuando se administra a un mamífero, es eficaz en la 20 producción del efecto terapéutico deseado, tal como inhibición de la actividad quinasa o inhibición del crecimiento tumoral.

25 La identificación de dicha enfermedad entra bien en la capacidad y conocimientos del experto en la técnica. Por ejemplo, los individuos humanos que sufren una enfermedad neoplásica o angiogénica clínicamente significativa o que están en riesgo de desarrollar síntomas clínicamente significativos son adecuados para la administración de los presentes anticuerpos de EGFR. Un clínico experto en la técnica puede determinar fácilmente mediante, por ejemplo, el uso de pruebas clínicas, exploración física y antecedentes médicos/familiares, si un individuo es un candidato a dicho tratamiento.

30 Los presentes anticuerpos anti-EGFR se pueden administrar para tratamientos terapéuticos a un paciente que sufre un tumor o una enfermedad asociada con angiogénesis en una cantidad suficiente para prevenir, inhibir o reducir la progresión del tumor o la enfermedad. Progresión incluye, por ejemplo, el crecimiento, la capacidad de invasión, la metástasis y/o la recurrencia del tumor o enfermedad. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como una dosis terapéuticamente eficaz. Cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la enfermedad y el estado general del propio sistema inmunológico del paciente. Los calendarios de dosificación también variarán con el estado de enfermedad y el estado del paciente, y normalmente variarán de un único bolo o una infusión continua a múltiples administraciones al día (p. ej., cada 4-6 horas) o según indique el médico encargado del tratamiento y el estado 35 del paciente. No obstante, se apreciará que la presente invención no está imitada a ninguna dosis concreta.

Un cóctel de antagonistas de EFGR, por ejemplo anticuerpos monoclonales, proporciona un tratamiento especialmente eficaz para inhibir el crecimiento de células tumorales. El cóctel puede incluir antagonistas del EGFR que no sean anticuerpos y puede tener tan pocos como 2, 3 o 4 antagonistas del receptor y tantos como 6, 8 o 10.

40 En una realización de la invención, los anticuerpos anti-EFGR se pueden administrar en combinación con uno o más agentes antineoplásicos. Para ejemplos de terapias de combinación, véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.217.866 (Schlessinger y col.). (Anticuerpos anti-EGFR en combinación con agentes antineoplásicos; documento WO 99/60023 (Waksal y col. (anticuerpos anti-EGFR en combinación con radiación). Se puede usar cualquier agente antineoplásico adecuado, tal como un agente quimioterapéutico, radiación o combinaciones de los mismos. El agente antineoplásico puede ser un agente alquilante o un anti-metabolito. Ejemplos de agentes alquilantes incluyen, entre otros, 45 cisplatino, ciclofosfamida, melfalán y dacarbazina. Ejemplos de anti-metabolitos incluyen, entre otros, doxorubicina, daunorubicina, paclitaxel, irinotecán (CPT-11) y topotecán. Cuando el agente antineoplásico es radiación, la fuente de la radiación puede ser externa (radioterapia con haz externo-EBRT) o interna (braquiterapia-BT) al paciente que se esté tratando. La dosis del agente antineoplásico administrado depende de numerosos factores, incluidos, por ejemplo, el tipo de agentes, el tipo y gravedad del tumor que se esté tratando y la vía de administración del agente. No obstante, debe destacarse que la presente invención no está imitada a ninguna dosis concreta. 50

Para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas, la administración de los anticuerpos de la invención como se ha descrito anteriormente se puede combinar con la administración de cualquier agente de tratamiento convencional. Por ejemplo, cuando la enfermedad hiperproliferativa es psoriasis, existen diversos agentes tópicos y sistémicos convencionales disponibles. Los agentes sistémicos para la psoriasis incluyen metotrexato y retinoides orales, tales como acitretina, etretinato e isotretinoína. Otros tratamientos sistémicos de la psoriasis incluyen hidroxiurea, AINE Los antibióticos y antimicrobianos se pueden usar para tratar o prevenir la infección que puede producir brotes y empeoramiento de la psoriasis. Los agentes tópicos para la psoriasis incluyen antralina, calcipotrieno, alquitrán, 55

corticosteroides, retinoides, queratolíticos y tazaroteno. Los esteroides tópicos son una de las terapias más habituales prescritas para la psoriasis de leve a moderada. Los esteroides tópicos se aplican en la superficie de la piel, pero algunos se inyectan en las lesiones psoriásicas.

5 Los tratamientos de las enfermedades hiperproliferativas incluyen además la administración de anticuerpos anti-EGFR en combinación con fototerapia. La fototerapia incluye la administración de luz de cualquier longitud de onda que reduce los síntomas de la enfermedad hiperproliferativa, así como la fotoactivación de un agente quimioterapéutico (fotoquimioterapia). Para debates adicionales del tratamiento de los trastornos hiperproliferativos, véase el documento WO 02/11677 (Teufel y col.). (Tratamiento de enfermedades hiperproliferativas con antagonistas del receptor del factor de crecimiento epidérmico).

10 Los anticuerpos anti-EGFR de la invención se pueden administrar con antagonistas del EGFR y/o antagonistas de las otras RTK, tales como anticuerpos que bloquean los ligandos de RTK o, por el contrario, neutralizar las RTK. Los ligandos del EGFR incluyen, por ejemplo, EGF, TGF- α , anfregulina, EGF de unión a la heparina (HB-EGF) y betacelulina. Se piensa que EGF y TGF- α son los principales ligandos endógenos que tienen como resultado la estimulación mediada por EGFR, aunque se ha demostrado que el TGF- α es más potente en la estimulación de la angiogénesis. De acuerdo con esto, los antagonistas de EGFR incluyen anticuerpos que se unen a dichos ligandos y, de este modo, bloquean la unión y la activación del EGFR.

15 Un ejemplo de otra de estas RTK es el VEGFR. En una realización de la presente invención se usa un anticuerpo anti-EGFR en combinación con un antagonistas del VEGFR. Un anticuerpo anti-EGFR se usa en combinación con un antagonista del receptor que se une específicamente al receptor de VEGFR-2/KDR (documento PCT/US92/01300 presentado el 20 de febrero de 1992; Terman y col., *Oncogene* 6: 1677-1683 (1991)). Un anticuerpo anti-EGFR se usa en combinación con un antagonista del receptor que se une específicamente al receptor de VEGFR-1/Flt-1 (Shibuya M. y col., *Oncogene* 5, 519-524 (1990)). Particularmente preferidas son las proteínas de unión a antígeno que se unen al dominio extracelular de VEGFR-1 o VEGFR-2 y bloquean la unión por el ligando (VEGF o P1GF), y/o neutralizan la activación inducida por VEGF o por P1GF. Por ejemplo, el AcMo IMC-1121 se une al KDR soluble y expresado en la superficie de la célula. El AcMo IMC-1121 comprende los dominios V_H y V_L obtenidos de una biblioteca de expresión en fagos de Fab humano. (Véase el documento WO 03/075840). En otro ejemplo, el ScFv 6.12 se une a Flt-1 soluble y expresado en la superficie de la célula. El ScFv 6.12 comprende los dominios V_H y V_L del anticuerpo monoclonal de ratón MAb 6.12. Una línea celular de hibridoma que produce Mab 6.12 se ha depositado como ATCC número PTA-3344.

20 Otro ejemplo de dicha RTK es el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFR). En ciertas células tumorales, inhibición de la función del EGFR se puede compensar mediante regulación por aumento de otras vías de señalización del receptor del factor de crecimiento y, en concreto, mediante la estimulación de IGFR. Además, la inhibición de la señalización del IGFR tiene como resultado un aumento de la sensibilidad de las células tumorales a ciertos agentes terapéuticos. La estimulación de EGFR o IGFR tiene como resultado la fosforilación de las moléculas de transducción de señal cadena abajo, incluidos Akt y p44/42, aunque en diferentes grados. De acuerdo con esto, en una realización de la invención, un antagonista del IGFR (p. ej., un anticuerpo que se une a IGF o IGFR y neutraliza el receptor) se coadministra con un anticuerpo de la invención, de modo que se bloquea una segunda entrada en la vía de señalización común cadena abajo (p. ej., inhibiendo la activación de Akt y/o p44/42). Un ejemplo de un anticuerpo humano específico de IGFR es IMC-A12 (véase el documento WO 2005/016970).

30 Otros ejemplos de receptores del factor de crecimiento implicados en la tumorigénesis son los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento neural (NGFR) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

35 Los anticuerpos anti-EGFR también se pueden administrar con antagonistas de RTK intracelular que inhiben la actividad de las RTK o sus elementos de señalización cadena abajo asociados que están implicados en el crecimiento tumoral o la angiogénesis asociada con el tumor. Los antagonistas de RTK intracelular son, preferentemente, moléculas pequeñas. Algunos ejemplos de moléculas pequeñas incluyen compuestos orgánicos, compuestos organometálicos, sales de compuestos orgánicos y de compuestos organometálicos, y compuestos inorgánicos. Los átomos en una molécula pequeña está unidos entre sí mediante enlaces covalentes e iónicos; el primero es típico para los compuestos orgánicos pequeños, tales como inhibidores de tirosina quinasa de molécula pequeña y el último es típico para compuestos inorgánicos pequeños. La ordenación de los átomos en una molécula orgánica pequeña puede representar una cadena, por ejemplo una cadena de carbono-carbono o una cadena de carbono-heteroátomo, o puede representar un anillo que contiene átomos de carbono, por ejemplo benceno o un sistema policíclico, o una combinación de carbono y heteroátomos, es decir heterociclos tales como una pirimidina o quinazolina. Aunque las moléculas pequeñas pueden tener cualquier peso molecular, generalmente incluyen moléculas que, de otro modo, se considerarían moléculas biológicas, excepto por que su peso molecular no es superior a 650 D. Las moléculas pequeñas incluyen tanto compuestos encontrados en la naturaleza, tal como hormonas, neurotransmisores, nucleótidos, aminoácidos, azúcares, lípidos y sus derivados, como compuestos fabricados por vías sintéticas, bien mediante síntesis orgánica Tradicional, síntesis mediada biológicamente o una combinación de las mismas. Véase, por ejemplo, Ganesan, *Drug Discov. Today* 7(1): 47-55 (Jan. 2002); Lou, *Drug Discov. Today*, 6(24): 1288-1294 (Dec. 2001).

Más preferentemente, la molécula pequeña que se va a usar como antagonista de RTK intracelular de acuerdo con la presente invención es un antagonista del EGFR intracelular que compite con el ATP por la unión a la región de unión intracelular del EGFR que tiene un dominio quinasa o a proteínas implicadas en las vías de transducción de la señal de la activación del EGFR. Ejemplos De dichas vías de transducción de la señal incluyen la vía de la proteína quinasa activada por el mitógeno ras (MAPK); la vía de la fosfatidilinositol-3-quinasa (P13K)-Akt, la vía de la proteína quinasa activada por estrés (SAPK) y los transductores y activadores de la señal de las vías de transcripción (STAT). Ejemplos no limitantes de proteínas implicadas en dichas vías (y a las que se puede unir un antagonista de EGFR de molécula pequeña) incluyen GRB-2, SOS, Ras, Raf, MEK, MAPK y matriz metaloproteinasas (MMP).

Un ejemplo de un antagonista de EGFR de molécula pequeña es IRESSA™ (ZD1939), que es un derivado de quinozalina que funciona como mimético del ATP para inhibir el EGFR. Véase la patente de EE.UU. N° 5,616,582 (Zeneca Limited); el documento WO 96/33980 (Zeneca Limited) en la pág. 4; véase también, Rowinsky y col., el Resumen 5 presentado en la 37 Reunión Anual de la ASCO, San Francisco, CA, 12-15 de mayo de 2001; Anido y col., el Resumen 1712 presentado en la Reunión Anual de la ASCO, San Francisco, CA, 12-15 de mayo de 2001. Otro ejemplo de antagonista de EGFR de molécula pequeña es TARCEVA™ (OSI-774), que es un derivado de 4-(fenilaminosustituido)quinozalina [6,7-Bis(2-metoxi-etoxi)-quinazolin-4-il]- (3 etinilfenil) amina clorhidrato] inhibidor del EGFR. Véase el documento WO 96/30347 (Pfizer Inc.) en, por ejemplo, página 2, línea 12 a página 4, línea 34 y la página 19, líneas 14-17. Véase también Moyer y col., Cancer Res., 57: 4838-48 (1997); Pollack y col., J. Pharmacol., 291: 739-48 (1999). TARCEVA™ puede funcionar mediante la inhibición de la fosforilación del EGFR y sus vías de transducción de señal cadena debajo de PI3/Akt y de la MAP (proteína activada por mitógeno) quinasa que tiene como resultado la detención del ciclo celular mediada por p27. Véase Hidalgo y col., Resumen 281 presentado en la 37 Reunión Anual de la ASCO, San Francisco, CA, 12-15 de mayo de 2001.

También se ha comunicado que otras moléculas pequeñas inhiben el EGFR, muchas de las cuales se piensa que son el dominio tirosina quinasa de un EGFR. Algunos ejemplos de dichos antagonistas de EGFR de molécula pequeña se describen en los documento WO 91/116051, WO 96/30347, WO 96/33980, WO 97/27199 (Zeneca Limited). Los documentos WO 97/30034 (Zeneca Limited), WO 97/42187 (Zeneca Limited), WO 97/49688 (Pfizer Inc.), WO 98/33798 (Warner Lambert Company), WO 00/18761 (American Cyanamid Company) y WO 00/31048 (Warner Lambert Company). Ejemplos de antagonistas específicos de EGFR de molécula pequeña incluyen CI-1033 (Pfizer), que es un inhibidor quinozalina (N-[4-(3-cloro-4-fluoro-fenilamino)-7-(3-morfolin-4-il-propoxi)-quinazolin-6-il]-acrilamida) de las tirosina quinasa, particularmente EGFR y se describe en el documento WO 00/31048 en la página 8, líneas 22-6; PKI166 (Novartis), que es un inhibidor de pirrolopirimidina de EGFR y se describe en el documento WO 97/27199 en las páginas 10-12; GW2016 (GlaxoSmithKline), que es un inhibidor de EGFR y HER2; EKB569 (Wyeth), que se ha comunicado que inhibe el crecimiento de las células tumorales que sobreexpresan EGFR o HER2 in vitro e in vivo; AG-1478 (Tryphostin), que es una molécula pequeña de quinazolina que inhibe la señalización de EGFR y de erbB-2; AG-1478 (Sugen), que es un inhibidor bisustrato que también inhibe la proteína quinasa CK2; PD 153035 (Parke-Davis), que se ha comunicado que inhibe la actividad de EGFR quinasa y el crecimiento tumoral, induce apoptosis en células en cultivo y potencia la citotoxicidad de los agentes quimioterapéuticos citotóxicos; SPM-924 (Schwarz Pharma), que es un inhibidor de tirosina quinasa dirigido al tratamiento del cáncer de próstata; CP-546,989 (OSI Pharmaceuticals), que se ha notificado que es un inhibidor de la angiogénesis para el tratamiento de tumores sólidos; ADL-681, que es un inhibidor de EGFR quinasa dirigido al tratamiento de cáncer; PD 158780, que es una piridopirimidina que se ha notificado que inhibe la velocidad del crecimiento tumoral de los xenoinjertos A4431 en ratones; CP-358,774, que es una quinazolina que se ha notificado que inhibe la autofosforilación en xenoinjertos HN5 en ratones; ZD1839, que es una quinazolina que se ha notificado que tiene actividad antitumoral en modelos de xenoinjerto de ratón, incluidos cánceres vulvar, NSCLC, de próstata, de ovarios y colorrectal; CGP 59326A, que es una pirrolopirimidina que se ha notificado que inhibe el crecimiento de xenoinjertos positivos a EGFR en ratones; PD 165557 (Pfizer); CGP54211 y CGP53353 (Novartis), que son dianilnoftalimidias. Los inhibidores de tirosina quinasa de EGFR naturales incluyen genisteína, herbimicina A, quercetina y erbaestatina.

Otras moléculas pequeñas que se ha notificado que inhiben el EGFR son compuestos tricíclicos, tales como los compuestos descritos en la patente de EE.UU. N° 5.679.683; derivados de quinazolina, tales como los derivados descritos en la patente de EE.UU. N° 5.616.582; y compuestos indol tales como los compuestos descritos en la patente de EE.UU. nº 5.196.446.

El antagonista de EGFR se puede administrar en combinación con uno o más adyuvantes adecuados, tales como, por ejemplo, citoquinas (IL-10 e IL-13, por ejemplo) u otros estimuladores inmunitarios, tales como, entre otros, quimioquinas, antígeno asociados con tumores y péptidos. Véase, *por ejemplo*, Larrivéey col., ant. No obstante, debe apreciarse que la administración de solo un anticuerpo anti-EGFR es suficiente para prevenir, inhibir o reducir la progresión del tumor de un modo terapéuticamente eficaz.

En una terapia de combinación, el anticuerpo anti-EGFR se administra antes, durante o después de comenzar la terapia con otro agente, así como cualquier combinación del mismo, es decir antes, durante y después o antes, durante y después de comenzar la terapia con el agente antineoplásico. Por ejemplo, el anticuerpo anti-EGFR se puede administrar entre 1 y 30 días, preferentemente 3 y 20 días, más preferentemente entre 5 y 12 días antes de comenzar la radioterapia.

La quimioterapia se administra de forma concurrente con, o, más preferentemente después, de la terapia con anticuerpos.

Se puede usar cualquier procedimiento o vía para administrar anticuerpos anti-EGFR de la invención y, opcionalmente, para coadministrar agentes antineoplásicos y/o antagonistas de otros receptores. Los regímenes con agentes antineoplásicos usados de acuerdo con la invención incluyen cualquier régimen que se cree que es óptimamente adecuado para el tratamiento de la afección neoplásica del paciente. Diferentes neoplasias malignas pueden requerir el uso de anticuerpos antitumorales específicos y de agentes antineoplásicos específicos, que se determinará en base a cada paciente. Las vías de administración incluyen por ejemplo, administración oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. La dosis antagonista administrada depende de numerosos factores, incluidos, por ejemplo, el tipo de antagonistas, el tipo y gravedad del tumor que se esté tratando y la vía de administración de los antagonistas. No obstante, cabe destacar que la presente invención no está limitada a cualquier mecanismo o vía de administración concretos.

Se debe observar que un anticuerpo anti-EGFR de la invención se puede administrar como conjugado, que se une específicamente al receptor y libera una carga letal tóxica tras la internalización del ligando-toxina. El conjugado anticuerpo-fármaco/molécula pequeña se puede unir directamente entre sí o a través de un ligador, péptido o no péptido.

Un anticuerpo anti-EGFR de la invención se puede unir química o biosintéticamente a uno o más agentes antineoplásicos o antiangiogénicos..

La invención se refiere además a anticuerpos anti-EGFR a los que los restos diana o indicadores están unidos. Los restos diana son los primeros miembros de los pares de unión. Los agentes antineoplásicos, por ejemplo, están conjugados a los segundos miembros de dichos pares y, de este modo, están dirigidos al sitio en el que se une el anticuerpo anti-EGFR. Un ejemplo común de dicho par de unión es avidina y biotina. La biotina puede estar conjugada a un anticuerpo anti-EGFR y, de este modo, proporciona una diana para un agente anti-neoplásico u otro resto, que está conjugado a avidina o estreptavidina. Como alternativa, la biotina u otro resto está unido a un anticuerpo anti-EGFR de la invención y se usa como indicador, por ejemplo en un sistema diagnóstico en el que un agente productor de señal detectable está conjugado a avidina o estreptavidina.

Se entiende que los anticuerpos anti-EGFR de la invención, cuando se usan en un mamífero con el fin de profilaxis o tratamiento, se administrarán en forma de una composición que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. Vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como combinaciones de los mismos. Vehículos farmacéuticamente aceptables pueden también comprender cantidades minoritarias de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la vida de almacenamiento o la eficacia de las proteínas de unión. Las composiciones de la presente invención se pueden, como se conoce bien en la técnica, formular de modo que proporcionen una liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo tras la administración al mamífero.

La presente invención también se refiere a kits para inhibir el crecimiento tumoral y/o la angiogénesis asociada al tumor, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-EGFR humano. Los kits pueden además contener cualquier antagonista adecuado de, por ejemplo, otro receptor del factor de crecimiento implicado en la tumorigénesis o la angiogénesis (p. ej., VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2, PDGFR, IGFR, NGFR, FGFR, etc., como se ha descrito anteriormente). Como alternativa, o además, los kits pueden además comprender un agente antineoplásico. En el presente documento se han descrito ejemplos de agentes antineoplásicos adecuados en el contexto de la presente invención. Los kits pueden además comprender un adyuvante, ejemplos de los cuales también se han descrito anteriormente.

Además, se describe el uso de los presentes anticuerpos *in vivo* e *in vitro* para procedimientos de investigación o diagnósticos, que son bien conocidos en la técnica. Los procedimientos diagnósticos incluyen kits, que contienen anticuerpos de la presente invención.

De acuerdo con esto, los presentes antagonistas del receptor pueden usarse *in vivo* e *in vitro* para procedimientos de investigación, diagnósticos, profilácticos o de tratamiento, que son bien conocidos en la técnica. Por supuesto, cabe entenderse y esperar que el experto en la técnica pueda realizar variaciones en los principios de la invención divulgados en el presente documento.

En ocasiones, el incremento de la activación del EGFR se asocia con las afecciones que se van a tratar de acuerdo con la presente invención. Niveles más altos de ligandos, amplificación del gen de EGFR, aumento de la transcripción del receptor o mutaciones que producen regulación por incremento de la señalización del receptor pueden tener como resultado un incremento de la activación del EGFR. La amplificación del gen que codifica el EGFR también tiene como resultado un incremento del número de ligandos que se unen al EGFR, que pueden además estimular la proliferación celular. El EGFR se puede sobreexpresar en ausencia de amplificación génica, posiblemente por mutaciones que incrementan la transcripción de EGFR, la traducción del ARNm o la estabilidad de la proteína. Los mutantes de EGFR se

han identificado en gliomas, carcinomas pulmonares amicrocíticos, carcinomas de ovarios y carcinomas de próstata que tienen una tirosina quinasa activa de forma constitutiva, lo que sugiere un papel para la actividad de alto nivel del EGFR en lugar de sobreexpresión de EGFR en estos cánceres. Véase, *por ejemplo*, Pedersen y col., Ann. Oncol., 12(6):745-60 (2001). Mutación de EGFR de tipo III, varios denominados EGFRvIII, de2-7 EGFR o AEGFR, carece de una porción del dominio extracelular de unión a ligando codificado por los exones 2-7), véase también Wikstrand et al., Cancer Res., 55:3140-3148 (1995).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención, pero no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención de ningún modo. Se pueden obtener descripciones detalladas de procedimientos convencionales, tales como los empleados en la construcción de vectores y plásmidos, la inserción de genes que codifican polipéptidos en dichos vectores y plásmidos, la introducción de plásmidos en las células huésped y la expresión y la determinación de las mismas de genes y productos génicos a partir de numerosas publicaciones, incluida Sambrook, J. y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Todas las referencias mencionadas en el presente documento se incorporan en su totalidad.

Ejemplo 1 - Aislamiento de anticuerpos anti-EGFR humanos

En breve, los anticuerpos humanos se aislaron de una biblioteca de bacteriófagos Fab humanos no tratados previamente obtenida de Dyax, Cambridge, MA, mediante selección por afinidad contra el EGFR humano soluble aislado de tumores positivos para EGFR. La biblioteca de bacteriófagos de Fab no usados previamente que contienen las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de las células productoras de anticuerpos de (linfocitos B periféricos) humanos se construyó a partir de seres humanos no inmunizados no tratados previamente y esplenocitos sin tumores de un paciente con carcinoma gástrico amplificando en reacciones primarias de PCR usando cebadores directos e inversos específicos del gen V y clonando estos genes V_H y V_L individuales en vectores distintos (documento WO 00/70023).

La reserva de la biblioteca de Fab se cultivó hasta la fase log, se rescató con el fago colaborador M13K07 y se amplificó durante la noche en medio 2YTAK (2YT que contiene 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y 50 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina) a 30 °C. La preparación del fago se precipitó en PEG al 4 %/NaCl 0,5M, se resuspendió en 3 % de leche sin grasa/PBS para bloquear la unión inespecífica.

Aproximadamente $1 \cdot 10^{12}$ ufp del fago pre-bloqueo se incubaron con 10^6 de células A431 que sobreexpresan 106 en 1 ml de medio DMEM sencillo a 4 °C durante 1 h, tras lo cual las células se lavaron 15 veces con PBS. El fago unido se eluyó mediante incubación a TA durante 30 minutos con 1 ml de PBS que contiene TMC-C225 a 0,5 mg/ml. Los fagos eluidos se incubaron con 10 ml de células TG1 en fase medio-log a 37 °C durante 30 minutos en equilibrio y 30 minutos en agitación. Las células TG1 infectadas se sedimentaron y sembraron en varias placas grandes 2YTAG y se incubaron durante la noche a 30 °C. Todas las colonias cultivadas en las placas se rasparon en de 3 a 5 ml de medio 2YTA, se mezclaron con glicerol (10 % de concentración final), se alicuotaron y se almacenaron a -70 °C. Para la siguiente ronda de selección, a 25 ml se añadieron 100 μl de la reserva de fagos y se cultivaron hasta la fase medio-log. El cultivo se rescató con el fago colaborador M13K07, se amplificó, se precipitó y se usó para selección tras el procedimiento descrito anteriormente.

Los clones TG1 individuales recuperados tras cada ronda de selección se escogieron aleatoriamente y se cultivaron a 37 °C en placas de 96 pocillos y se rescataron con el fago colaborador M13K07 como se ha descrito anteriormente. La preparación del fago se bloqueó con 1/6 del volumen de 18% de leche/PBS a TA durante 1 hora y se añadió a placas de microtitulación de 96 pocillos Maxi-sorp (Nunc) revestidas con EGFR recombinante (1 $\mu\text{g/ml}$ x 100 μl). Tras incubar a TA durante 1 hora, las placas se lavaron tres veces con PBST y se incubaron con un conjugado anti-fago M13-HRP de ratón (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Las placas se lavaron cinco veces, se añadió sustrato de TMB peroxidasa (KPL, Gaithersburg, MD) y la absorbancia a 450 nm se leyó usando un lector de microplacas (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Los clones identificados se analizaron después para determinar el bloqueo de la unión de EGF. Las huellas de ADN de los clones se usaron para diferenciar los clones únicos. Se escogieron clones representativos de cada patrón de digestión y se sometieron a secuenciación de ADN.

Ejemplo 2 - Expresión y purificación de los fragmentos Fab solubles

Se usaron plásmidos que contienen los genes que codifican el Fab 11F8 para transformar un huésped *E. coli* no supresor HB2151. La expresión de los fragmentos Fab en HB2151 se indujo cultivando las células en medio 2YTA que contiene isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido 1 mM (IPTG, Sigma) a 30 °C. Un extracto periplásmico de las células se preparó resuspendiendo el sedimento celular en Tris 5 mM (pH 7,5) que contiene sacarosa al 20 % (p/v), NaCl 200 mM, EDTA 1 mM y PMSF 1 mM, seguido de incubación a 4 °C con suave agitación durante 1 hora. Tras la centrifugación, la proteína Fab soluble se purificó del sobrenadante mediante cromatografía de afinidad usando la columna de la Proteína G siguiendo el protocolo del fabricante (Amersham Pharmacia Biotech).

Ejemplo 3 - Construcción de anticuerpos IgG1 anti-EGFR humanos

5 El Fab anti-EGFR humano se sometió a ingeniería genética en una IgG1 humana completa. Un Fab candidato seleccionado, C11F8, se identificó de una biblioteca de expresión en fagos Fab humanos no tratados previamente según la afinidad elevada de la unión y la actividad de bloqueo del ligando del EGFR humano (ErbB). Las secuencias de ADN que codifican las regiones variables de los genes de Fab 11F8 de la cadena ligera (SEC ID N° 15) y de la cadena pesada (SEC ID N° 7) se obtuvieron mediante amplificación por PCR y se clonaron en un vector de expresión que contenía los dominios constantes de la IgG1 humana usando el sistema de expresión de la glutamina sintasa de Lonza Biologics, Inc.

La amplificación por PCR se realizó en dos etapas usando el kit de PCR Expand PCR (Boehringer Mannheim, Inc.) de acuerdo con las especificaciones del fabricante y los cebadores enumerados en la Tabla 3.

10

TABLA 3- Cebadores para amplificación por PCR

Cebador	Secuencia nucleotídica	SEC ID N°
C11F8HF	5' TCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTCACAGGTGCAGCTGCAGAA -3'	20
C11F8HR	5' -CGAGCTAGCGCTTGAGACGGTGACCAGGGTG-3'	21
C11 FHLF	5' - TCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTCAGAAATTGTGATGACACA-3'	22
C11F8LR	5' -CGATCTAGAACTCACGTTTGATCTCCGCTTGGTC-3'	23
OSIF	5' -GAGAAGCTTGCCGCCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGC- 3'	24

15 Brevemente, los productos de la PCR de las cadenas pesada y ligera se amplificaron usando 25 ng del ADN del plásmido con Fab C11F8 como molde y el par de cebadores directo e inverso para las cadenas pesada (C11F8HF y C11F8HR) y ligera (C11F8LF y C11F8LR) en 50 µl de reacciones del sistema de tampón expandido n° 3 en las condiciones de ciclado que se indican en la Tabla 4:

TABLA 4

1 ciclo	94 °C	2 minutos
5 ciclos	94 °C	20 segundos
	48 °C	2 minutos
	68 °C	20 segundos
20 ciclos	94 °C	20 segundos
	65 °C	60 segundos
	68 °C	2 minutos
1 ciclo	65 °C	5 minutos

20 Los productos resultantes de la PCR añaden una secuencia de 57 pares de bases al extremo 5' de los genes de inmunoglobulina que codifican la secuencia señal del gen de la cadena pesada de ratón de 19 aminoácidos (MGWSCIIILFLVATATGVHS, SEC ID N° 25), que permite un procesamiento y secreción eficiente de la inmunoglobulina. Para un inicio eficiente de la traducción de los genes en células de mamífero se añadió una secuencia "Kozak" (J. Mol. Biol. 196:947) amplificando la cadena pesada y ligera en una reacción de PCR secundaria usando el cebador directo OSIF en combinación con CH11F8HR o C11F8LR respectivamente. Este producto de PCR también proporciona

un sitio de endonucleasa de restricción Hind III en 5' para clonar el producto amplificado en un vector de expresión adecuado.

5 El fragmento de la cadena pesada HindIII-NheI purificado en gel de agarosa se clonó en un vector dirigido al promotor de CMV, pDFc (Figura 1A) para generar una región de codificación de ADNc contigua de la secuencia de ADN de las regiones variables y constantes. Un fragmento de la cadena ligera Hind III Xba se clonó en un segundo vector director del promotor CMV, p12.1L (Figura 1B). La construcción resultante contiene un único intrón que separa las regiones constantes kappa y variables ligeras, que se somete a corte y empalme eficiente a partir de un transcrito de ARN naciente. Los plásmidos recombinantes se transformaron en *E. coli* competentes y los aislamientos plasmídicos seleccionados se sometieron a detección selectiva para la coexpresión transitoria de las cadenas pesada y ligera en células COS.

10 **Ejemplo 4 - Expresión de anticuerpos IgG1 anti-EGFR humanos**

Para la transfección estable se generó un único vector plasmídico clonando el fragmento Not I-Sal I del casete de expresión de la cadena pesada que contiene el promotor del CMV en el vector p12.1L que contiene la cadena ligera. El vector plasmídico resultante, pGS-11F8, se sometió a mapeo de restricción (véase la Figura 1C). El análisis del digesto de restricción se mostró en la figura 2.

15 La línea celular recombinante usada para la producción del anticuerpo monoclonal 11F8 deriva de la línea celular de mieloma murino no secretor, NS0 (a la que se hace referencia en Barnes y col., Cytotechnology 32:109 (2000)). La línea celular NS0 se obtuvo de Lonza Biologics, Inc. (Slough, Berkshire, Reino Unido).

20 La línea celular de mieloma, NS0, se transfeccionó con el plásmido pGS-11F8 mediante electroporación usando el BioRad Gene Pulser II, con una tensión fijada a 250 V con una capacitancia de 400PFd y una constante de tiempo observada de 9,0 ms. Las células electroporadas se resuspendieron en DMEM (JRH Biosciences, Inc., Lenexa, KS) que contiene 10 % de suero bovino detal dializado, dFCS (HyClone, Logan, UT) y glutamina 2 mM (InVitrogen/Life Technologies, Paisley, PA). 50 µl de las células resuspendidas se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5.000-10.000 células por pocillo. Los transfectantes positivos para la glutamina sintetasa (GS) se seleccionaron mediante la adición de medio DMEM sin glutamina que contiene 10 % de dFCS suplementado con 1 x GS (JRH Biosciences, Inc.) 24 horas tras la transfección. Las células se cultivaron durante 2-4 semanas a 37 °C, 5 % de CO₂ para permitir el crecimiento y expansión de las colonias antes de la detección selectiva de clones que expresa el anticuerpo.

25 Los clones que expresan el anticuerpo anti-EGFR se sometieron a detección selectiva usando ELISA basado en Fc (gamma) anti-humano con peroxidada de rábano y la detección se realizó a A_{450nm}. Los clones positivos se expandieron y volvieron a analizar en un periodo de cultivo de 3-5 días. Los clones positivos fuertes (producción de anticuerpo de 25 µl/mg o más) se expandieron para su análisis posterior. En base a resultados de la producción del lote de anticuerpos de 249 µg/ml se seleccionó el clon 34 para subclonación por dilución límite y se volvió a evaluar. Se seleccionó el clon 34-5 en base a niveles de producción consistentes comparables o mejores que la línea celular parental (producción e lote= 310 µg/ml, alimentación-lote= 0,75-0,8 g/l. El clon 34-5-3 se aisló el clon 34-5-3 tras una segunda ronda de subclonación y el análisis mostró que el clon 34-5-3 produce un nivel elevado de anticuerpo (producción de lote= 324 µg/ml, alimentación del lote= 1,0-1,2 g/l) En los ejemplos siguientes se llevó a cabo una caracterización adicional de este clon.

35 **Ejemplo 5 - Unión *in vitro* de los anticuerpos anti-EGFR**

40 Los anticuerpos se seleccionaron en un ELISA de estado sólido de comparación de las características de unión de IMC-11F8 e IMCC225. Una placa de microtitulación de noventa y seis pocillos se revistió durante la noche con 1 µg/ml en tampón carbonato a 4 °C. Las placas se bloquearon con solución salina tamponada con fosfato (PBS) complementada con 10 % de suero bovino de neonato durante una hora a 37 °C. Varias cantidades de IMC-11F8 o IMC-C225 se añadieron a las placas y se incubaron a temperatura ambiente durante otros 60 minutos, seguido de lavado con PBS. Se añadieron el conjugado de peroxidasa de rábano (HRP)-anticuerpo Fc anti-humano de ratón y se incubaron durante 60 minutos adicionales a temperatura ambiente, seguido de un lavado extenso con PBS. La placa se incubó después con sustrato de HRP durante 30 segundos-2 minutos y la reacción se detuvo con H₂SO₄ 0,1M. Las placas se leyeron usando un lector de ELISA a DO₄₅₀ nm.

45 La Figura 3 muestra la unión de los anticuerpos IMC-11F8 e IMC-C225 a EGFR. IMC-11F8 e IMC-C225 exhiben una unión comparable a EGFR.

Ejemplo 6 - Cinética de unión de los anticuerpos anti-EGFR

50 La cinética de la unión de los anticuerpos IgG IMC-11F8 e IMC-C225 y sus respectivos fragmentos Fab se midieron usando un sensor BIAcore (Pharmacia Biosensor,), la proteína de fusión EGFR-AP se inmovilizó sobre un circuito sensor y los anticuerpos IgG IMC-11F8 e IMC-C225 se inyectaron a concentraciones variables de 1,5 nM a 100 nM. Los sensogramas se obtuvieron a cada concentración y se analizaron mediante BIA Evaluation 2.0, un programa para

determinar las constantes de velocidad k_{on} y k_{off} . La constante de afinidad K_d se calculó a partir de la proporción de las constantes de la velocidad k_{on}/k_{off} .

La cinética de unión de los anticuerpos anti-EGFR de la presente invención se ilustran en la Tabla 5. Esta muestran que ambos anticuerpos IgG tienen una cinética de unión a EGFR comparable.

5

TABLA 5

Anticuerpo	Formato	K_{on} ($10^5 M^{-1} S^{-1}$)	K_{off} ($10^{-4} s^{-1}$)	K_d (nM)
IMC-11F8	Fab	$22,9 \pm 9,9$	$36,7 \pm 8,5$	$1,78 \pm 0,5$
IMC-11F8	IgG	$18,6 \pm 7,7$	$5,8 \pm 2,2$	$0,32 \pm 0,06$
IMC-C225	Fab	$23,1 \pm 4,8$	$11,7 \pm 3,4$	$0,53 \pm 0,17$
IMC-C225	IgG	$21,3 \pm 7,3$	$5,4 \pm 1,0$	$0,3 \pm 0,2$

Los resultados representan la media \pm SE de al menos tres determinaciones distintas.

Ejemplo 7 - Especificidad de los anticuerpos por EGFR

10 La unión del anticuerpo a EGFR se evaluó mediante un ensayo de competición de ^{125}I -EGF. Las células HT29 se sembraron a 2×10^4 células por pocillo en placas COSTAR™ de 24 pocillos (Fisher Scientific, U.S.A.) en medio MacCoy 5A suplementado con $-$ glutamina 1,5 mM, 1 % de CS y antibióticos a 37 °C. La monocapa celular se incubó después a temperatura ambiente durante 1 hora con varias concentraciones de EGF sin marcar, 11F8 o IMC-C225 que se mezclaron con varias cantidades de EGF marcado con ^{125}I . Las células se lavaron con PBS frío y la radioactividad asociada con las células se midió en un contador gamma.

15 La Figura 4 muestra la inhibición de la unión ^{125}I -EGF a EGFR sobre las células HT29. A concentraciones de entre 10 a 100 nM, IMC-11F8 es tan eficaz como IMC-C225 en la inhibición de la unión de ^{125}I -EGF a EGFR sobre las células HT29. Ambos anticuerpos son mejores en la competición por la unión que EGFR, el ligando natural de EGFR. Se observaron resultados similares para la inhibición de la unión ^{125}I -EGF a EGFR sobre las células A431.

Ejemplo 8 - Activación del EGFR

20 Brevemente, se llevó a cabo un ensayo de activación del receptor de quinasa (ensayo KIRA) o un ensayo de fosforilación usando BxPC3 o células A431. Las células se cultivaron primero hasta un 90 % de confluencia en DME suplementado con L -glutamina 4 mM ajustado para contener 1,5 g/l de bicarbonato sódico y 4,5 g/l de glucosa, 10 % de CS a 37 °C. Antes de la experimentación, se privó de alimentación a las células durante 24 horas en DME suplementado con 0,5 % de CS. Para evaluar los efectos de los anticuerpos IMC-11F8, IMC-C225 y IMC-1C11 sobre la activación inducida por EGF de EGFR, varias concentraciones de anticuerpos se unieron previamente a temperatura ambiente durante 30 minutos, seguido de estimulación con EGF a 8 ng/ml durante otros 15 minutos. Tras estimulación, las monocapas celulares se lavaron con PBS helado que contiene ortovanadato sódico 1 mM. Las células se lisaron en tampón de lisis [Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, Triton X-100 al 1 %, NaCl 137 mM, glicerol al 10 %, EDTA 10 Mm, ortovanadato sódico 2 mM, NaF 100 mM, pirofosfato sódico 100 Mm, PEFABLOC® SC 5 mM (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN), 100 μ g de aprotinina y leupeptina 100 μ g/ml de leupeptina] y se centrifugó a 14.000 x g durante 10 minutos. Los lisados celulares limpios se añadieron a los pocillos de placas de 96 pocillos con anticuerpo policlonal anti-EGFR. Las placas se lavaron para eliminar las proteínas unidas inespecíficamente y el nivel de fosforilación de EGFR se evaluó mediante la adición de anticuerpos anti-fosfotirosina.

Tras un extenso lavado, la cantidad de anticuerpo anti-fosfotirosina unido se midió usando un lector de ELISA a $DO_{450\text{ nm}}$.

35 Los resultados muestran una disminución marcada de la fosforilación de EGFR por el anticuerpo IMC-11F8 tanto en células BxPC3 (Figura 5) como A431 (Figura 6) analizadas en comparación con el anticuerpo control IMC-1C11.

40 La inhibición de la fosforilación de EGFR estimulada por EGF se evaluó además mediante análisis de transferencia Western del EGFR inmunoprecipitado. Las células A431 se unieron previamente con anticuerpos, seguido de la estimulación con EGF como se ha descrito anteriormente. Se usó un anticuerpo control que se une a EGFR pero no inhibe la fosforilación de EGFR. La proteína (EGFR) se inmunoprecipitó en lisados limpios usando el anticuerpo policlonal anti-EGFR, seguido de perlas de proteína A en séferosa. Las perlas unidas se lavaron después una vez con Triton-X-100 al 0,2 %, Tris-HC 10 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM (Tampón A), dos veces con Tampón a que contiene NaCl

500 mM y dos veces con Tris-HCl, pH 8,0. Las perlas drenadas se mezclaron con 30 μ l de 2 X SDS de tampón de carga, se llevaron a ebullición y el sobrenadante se sometió a SDS-PAGE. Tras la separación de las proteínas mediante electroforesis, las bandas proteicas se transfirieron sobre filtros de nitrocelulosa para análisis de transferencia Western. Los filtros se bloquearon durante la noche en tampón de bloqueo, Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl (TBS) 150 mM que contiene seroalbúmina bovina al 5 % y leche desecada desgrasada al 10 %. Para detectar el receptor fosforilado, las transferencias se sondaron con un anticuerpo anti-fosfotirosina en tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, las transferencias se lavaron abundantemente con 0,5 de TBS que contiene Tween-20 (TBS-T) al 0,1 % y se incubaron con Ig de cabra anti-ratón conjugada con HRP (Amersham, Little Chalfont, Reino Unido). Las transferencias se lavaron con TBS y se incubaron durante 1 minuto con un reactivo quimioluminiscente (ECL, Amersham, Little Chalfont, Reino Unido). La anti-fosfotirosina que reacciona con las proteínas fosforiladas se detectó mediante exposición a una película de detección de luminiscencia de alto rendimiento (Hyperfilm-ECL, Amersham, Little Chalfont, Reino Unido) durante de 0,5 a 10 minutos.

El análisis de transferencia tipo Western de la Figura 7A muestra que IMC-11F8, como IMC-C225, inhibe la fosforilación de EGFR. Ni las células tratadas con el anticuerpo-EGF ni las tratadas con el anticuerpo control inhiben completamente la fosforilación de EGFR. La Figura 7B muestra que la síntesis de EGFR no se inhibe con la adición de los anticuerpos a las células. La Figura 8 muestra que la fosforilación del EGFR es inhibida por IMC-11F8. Se observó una inhibición superior al 70 % para tres líneas de células tumorales de origen distinto (A431, BxPC3, HT-29) a la menor concentración del anticuerpo analizada (0,8 nM).

También se investigó el efecto de IMC-11F8 sobre una de las principales moléculas de señalización cadena abajo del EGFR, las MAP quinasas p44/p42. IMC-11F8 bloqueó la fosforilación de las MAP quinasas p44/42 tras estimulación con EGF en células A431, BxPC3 y HT-29 de un modo dependiente de la dosis (Fig. 4).

Ejemplo 9 - Inhibición de la proliferación celular

El ensayo de proliferación celular MTT se mide colorimétricamente como resultado de la reducción del amarillo tetrazolio, MTT (bromuro de 4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-feniltetrazolio) por células metabólicamente activas en un producto intracelular de formazán morado, que se puede solubilizar y cuantificar por medios espectrofotométricos. Brevemente, las células DiFi se cultivaron durante la noche en DMEM-10% CS. Se añadieron anticuerpos IMC-11F8, IMC-C225 o IMC-1C11 a pocillos por triplicado y se incubaron durante 72 horas adicionales a 37 °C, CO₂ al 5 %. Para medir el crecimiento celular, a cada pocillo se añadió un alícuota de 20 μ l de pigmento de tetrazolio y las células se incubaron durante 3 horas a 37 °C. Cuando el precipitado morado fue claramente visible bajo un microscopio, las células se lisaron mediante la adición de 100 μ l del reactivo detergente. La absorbancia del producto de formazán se midió a una DO_{570nm} como cuantificación de la proliferación.

Como se muestra en la Figura 9, al contrario que el anticuerpo control IMC-1 C11, IMC-11F8 es un inhibidor de la proliferación celular tan potente como IMC-C225.

Ejemplo 10 - Actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)

Un procedimiento de evaluación de la muerte celular es a través de un ensayo de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo o ADCC, que, en general, usa el radioisótopo ⁵¹Cr. Las células diana marcadas con ⁵¹Cr se mezclaron con anticuerpo y el grado de muerte se evaluó mediante la liberación de ⁵¹Cr. Brevemente, aproximadamente 3 x 10⁶ células DiFi se suspendieron en 0,5 μ l de medio de cultivo y se añadieron 0,5 mCi de Na⁵¹CrO₄. La mezcla se incubó durante 1 hora a 37 °C con agitación ocasional. Después, las células se lavaron tres veces con medio de cultivo frío. Las células marcadas se suspendieron después en 100 μ l de medio de cultivo que contiene concentraciones variables de anticuerpos anti-EGF (IMC-11F8 o IMC-C225) y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Se añadió complemento de conejo y las células tratadas se incubaron adicionalmente a 37 °C durante 1 hora. Después se añadieron 50 μ l de medio frío y se centrifugó. A continuación se extrajeron los sobrenadantes y se midió la radioactividad liberada por las células al sobrenadante en un contador gamma. La liberación máxima de la radioactividad se obtuvo añadiendo 1% de Tritón X-100 a las células diana. El porcentaje de citotoxicidad se calculó como la liberación experimental en cpm menos las cpm iniciales por 100 %, que, después, se divide por la liberación máxima en cpm menos las cpm iniciales.

La Figura 10 muestra la muerte celular por IMC-11F8 e IMC-C225 (o ERBITUX™) mediante activación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo o actividad ADCC).

Ejemplo 11 - Inhibición *in vivo* del crecimiento de las células tumorales en ratones

Se diseñaron estudios *in vivo* anti-tumores para determinar si IMC-11F8 bloquearía el crecimiento de las células tumorales en un modelo de xenoinjerto. En ratones atímicos (nu/nu; Charles River Lab, Wilmington, MA) se inyectó en el flanco por vía subcutánea 1-2 millones de células A431 o BxPC-3. Se administraron anticuerpos anti-EGFR (IMC-11F8 e IMC-C225) o anticuerpo control por vía intraperitoneal a 1 mg/dosis o 0,3 mg/dosis, tres veces a la semana. El tamaño del tumor se midió al menos tres veces a la semana con un compás y se calculó el volumen de tumor (véase, por ejemplo, Baselga y col., J Natl. Cancer Inst. (1993) 85: 1327-1333)

La Figura 11 muestra la actividad anti-tumoral de IMC-11F8 en un modelo de xenoinjerto A431. A una dosis de 1 mg (Figura 11, panel derecho, IMC-11F8 es tan eficaz como IMC-C225 (CETUXIMAB) en la supresión o inhibición del crecimiento tumoral en comparación con los animales control. A una dosis menor, de 0,3 mg, se retrasa la progresión del crecimiento tumoral. De un modo similar, la Figura 12 muestra el efecto de IMC-C11F8 e IMC-C225 en un segundo modelo tumoral (xenoinjerto BxPC3). La cinética del crecimiento del tumor BxPC3 es similar a la observada en el modelo tumoral A431. A un nivel de dosis de 1,0 mg/ratón/inyección, IMC-11F8 condujo a 6 regresiones tumorales de 8 animales portadores de A413 y 5 regresiones tumorales de 8 ratones portadores de BxPC3.

La tinción inmunohistoquímica de las secciones de xenoinjerto A431 y BxPC3 reveló que el tratamiento con IMC-11F8 reducía marcadamente la densidad de las células tumorales y aumentaba el área de residuos acelulares necróticos dentro de los tumores (Fig. 13). Además, IMC-11F8 redujo el porcentaje de células positivas Ki-67 en toda la sección del tumor, lo que indica una reducción de la proliferación celular dentro de los tumores (Fig. 13).

Ejemplo 12 - Terapia de combinación con IMC-11F8

Ratones atímicos portadores de xenoinjertos de tumor colorrectal humano, GEO, DLD-1, o HT-29, de aproximadamente 200-300 mm³ fueron tratados mediante inyección interperitoneal o IMC-11F8 dos veces a la semana a 0,3 mg o 1,0 mg/inyección, solo o en combinación con irinotecán (CPT-11) a una dosis de 100 mg/kg una vez a la semana. Los tamaños de los tumores se midieron dos veces a la semana.

El tratamiento con IMC-11F8 a 0,3 mg o a 1,0 mg/ratón/inyección inhibió significativamente el crecimiento de los tres xenoinjertos colorrectales (GEO, DLD-1, o HT-29; Fig. 14A-C). Cuando se administró a ratones portadores de xenoinjertos GEO en combinación con CPT-11, IMC-11F8 aumentó significativamente la inhibición del crecimiento tumoral observado con CPT-11 solo (Fig. 14A; $p < 0,01$ para ambas dosis de IMC-11F8). Además, mientras que el CPT-11 solo no produjo regresiones tumorales en este modelo, se alcanzaron 4 de 10 y 9 de 10 regresiones tumorales cuando se combinó CPT-11 con IMC-11F8 a 0,3 mg o 1,0 mg/ratón/inyección, respectivamente ($p = 0,004$ y $p < 0,0001$, respectivamente). Se observaron similares efectos antitumorales de la combinación en otros dos xenoinjertos DLD-1 (Fig. 14B) y HT-29 (Fig. 14C) con una significación estadística similar en la regresión tumoral en el grupo de dosis de anticuerpo más alta (1,0 mg). La Fig. 14D ilustra el incremento significativo del número de regresiones tumorales observado cuando CPT-11 se combina con IMC-11F8 en estos modelos de xenoinjerto de carcinoma colorrectal.

Ejemplo 13 - Farmacocinética de IMC-11F8

La farmacocinética de IMC-11F8 se estudió en monos cinomolgos y se comparó con la farmacocinética de IMC-C225. Por separado, se inyectó por vía intravenosa una única dosis del estudio farmacocinético a 20,5 mg/kg de IMC-11F8 e IMC-C225 radiomarcados con ¹²⁵I en monos y se extrajo sangre el día para determinar el nivel de anticuerpo que se conserva en el plasma del animal. En la Tabla 6 proporciona una comparación de la farmacocinética de de IMC-11F8 e IMC-C225 en monos cinomolgos.

TABLA 6

	IMC-11 F8	IMC-C225
C _{máx} (mg/l)	1213	1161
T _{máx} (h)	0,75	0,117
T _{1/2} (h)	116	117
AUC (mg*h/l)	115400	97871
Cl (ml/h)	0,736	0,636

Se entiende y espera que el experto en la técnica pueda realizar variaciones en los principios de la invención divulgados en el presente documento.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Eli Lilly

<120> ANTICUERPO FRENTE AL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO HUMANO

<130> x18508

<140> PCT/US2005/009583

5 <141> 2005-03-21

<150> US 60/554555

<151> 2004-03-19

<160> 25

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Homo sapiens

<400> 1

agtgtgatt actactggag t 21

<210> 2

20 <211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

25 Ser Gly Asp Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 3

<211> 48

<212> ADN

<213> Homo sapiens

30

<400> 3

tacatctatt acagtgggag caccgactac aaccgtccc tcaagagt 48

<210> 4

<211> 16

ES 2 387 809 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

5 Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 5

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10

<400> 5

gtgtcgatt ttggagtggg gacattgac tac 33

<210> 6

<211> 11 <212> PRT

15

<213> Homo sapiens

<400> 6

Val Ser Ile Phe Gly Val Gly Thr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 7

20

<211> 363

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 7

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc	60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtggtgatt actactggag ttggatccgc	120
cagccccag ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gagcaccgac	180
tacaaccctg ccctcaagag tcgagtcacc atgtccgtag acacgtccaa gaatcagttt	240
tccctgaagg tcaactctgt gaccgccgca gacacggctg tgtattactg tgcgagagtg	300
tcgatttttg gagtggggac atttgactac tggggccagg gcaccctggt caccgtctca	360
agc	363

25

<210> 8

<211> 121

<212> PRT

ES 2 387 809 T3

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Asp Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Val Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Val Ser Ile Phe Gly Val Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 9

<211> 33

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 9

10 agggccagtc agagtgttag cagctactta gcc 33

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 10

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 11

ES 2 387 809 T3

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5 <400> 11 21

gatgcatcca acagggccac t 21

<210> 12

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

15 <210> 13

<211> 27

<212> ADN

<213> Homo sapiens

20 <400> 13

caccagtatg gtagcacacc tctcact 27

<210> 14

<211> 9

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

His Gln Tyr Gly Ser Thr Pro Leu Thr
1 5

30 <210> 15

<211> 321

<212> ADN

<213> Homo sapiens

ES 2 387 809 T3

<400> 15

gaaattgtga tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agctacttag cctggtagca acagaaacct 120
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
 gaagattttg cagtgattta ctgtcaccag tatggttagca cacctctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg cggagatcaa a 321

<210> 16

5 <211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

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

<210> 17

<211> 10

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

20

ES 2 387 809 T3

<400> 17

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 18

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

10

<400> 18

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 19

<211> 15

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

20

<400> 19

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 20

<211> 55

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintética

30

<400> 20

tccttttct agtagcaact gcaactggag tacattcaca ggtgcagctg cagaa 55

<210> 21

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> sintética

<400> 21

cgagctagcg cttgagacgg tgaccagggt g 31

10 <210> 22

<211> 55

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> sintética

<400> 22

tccttttct agtagcaact gcaactggag tacattcaga aattgtgatg acaca 55

20 <210> 23

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> sintética

<400> 23

cgatctagaa ctcacgttg atctccgcct tggtc 35

30

<210> 24

<211> 53

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> sintética

<400> 24

5 <210> 25

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

10 <400> 25

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser

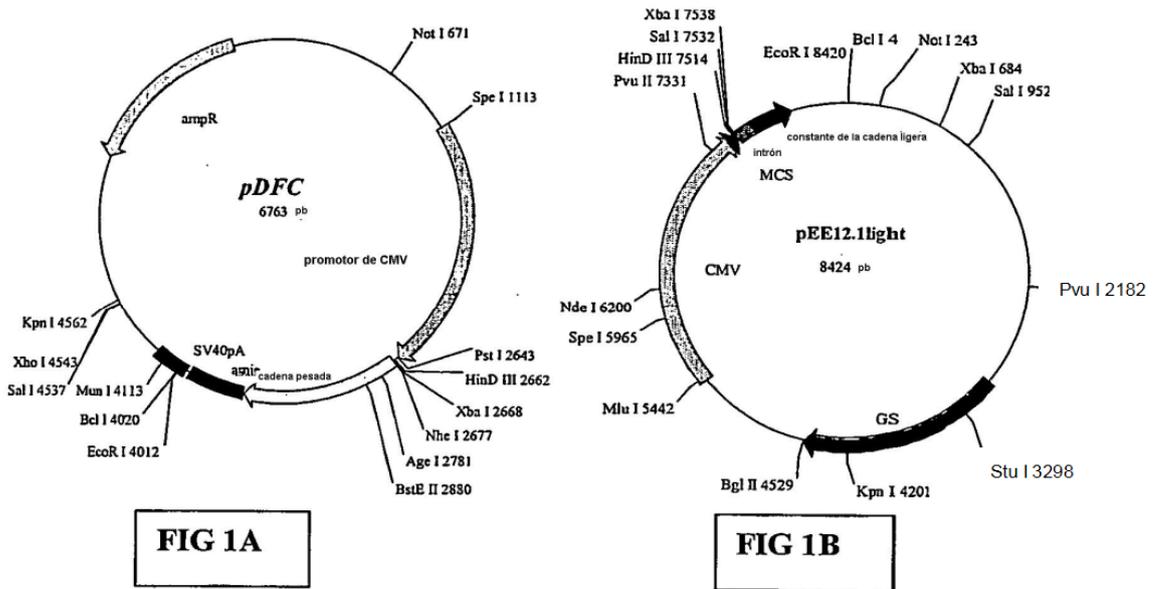
REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-EGFR humano aislado, que comprende la región variable de la cadena pesada de SEC ID N° 8 y la región variable de la cadena ligera de SEC ID N° 16.
- 5 2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que inhibe la unión del ligando de EGF a EGFR.
3. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que neutraliza el EGFR.
4. El fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que está seleccionado a partir de un anticuerpo de cadena sencilla, un Fab, un Fv de cadena sencilla, un diacuerpo, un triacuerpo, Fc, fragmentos bivalentes (Fab)₂ y un anticuerpo de un solo dominio.
- 10 5. Un conjugado del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
6. El conjugado de la reivindicación 5, que comprende un agente antineoplásico, un resto diana o un resto indicador.
7. Un ácido nucleico aislado que codifica la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de las reivindicaciones precedentes.
8. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 7.
- 15 9. Una célula huésped recombinante que comprende el vector de expresión de la reivindicación 8.
10. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un conjugado del mismo para usar como medicamento para inhibir el crecimiento tumoral en un mamífero.
11. El anticuerpo de la reivindicación 10 para su uso como medicamento, en el que el medicamento es para inhibir el crecimiento tumoral en un mamífero, en el que el tumor expresa EGFR.
- 20 12. El anticuerpo de la reivindicación 10 para su uso como medicamento, en el que el medicamento es para inhibir el crecimiento tumoral en un mamífero, en el que el tumor sobreexpresa EGFR.
13. El anticuerpo de la reivindicación 10 para su uso como medicamento, en el que el medicamento es para inhibir el crecimiento tumoral en un mamífero, en el que el tumor es un tumor primario.
- 25 14. El anticuerpo de la reivindicación 10 para su uso como medicamento, en el que el medicamento es para inhibir el crecimiento tumoral en un mamífero, en el que el tumor es un tumor metastásico.
15. El anticuerpo de la reivindicación 10 para su uso como medicamento, en el que el medicamento es para inhibir el crecimiento tumoral en un mamífero, en el que el tumor es un tumor refractario.
16. El anticuerpo de la reivindicación 10 para su uso como medicamento, en el que el medicamento es para inhibir el crecimiento tumoral en un mamífero, en el que el tumor es un tumor vascularizado.
- 30 17. El anticuerpo de la reivindicación 10 para su uso como medicamento, en el que el medicamento es para inhibir el crecimiento tumoral en un mamífero, en el que el tumor se selecciona de un tumor colorrectal, un tumor de cabeza y cuello, un tumor pancreático, un tumor pulmonar, un tumor de mama, un carcinoma de células renales y un glioblastoma.
18. El anticuerpo de la reivindicación 10 para su uso como medicamento, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se administra en combinación con un agente antineoplásico.
- 35 19. El anticuerpo de la reivindicación 18, en el que el agente antineoplásico es un agente quimioterapéutico.
20. El anticuerpo de la reivindicación 18, en el que el agente antineoplásico es irinotecán (CPT-11).
21. El anticuerpo de la reivindicación 18, en el que el agente antineoplásico es radiación.
22. El anticuerpo de la reivindicación 10 para su uso como medicamento, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se administra con un antagonista de EGFR.
- 40 23. El anticuerpo de la reivindicación 22, en la que el antagonista del Eger es un antagonista de EGR intracelular.
24. El anticuerpo de la reivindicación 10 para su uso como medicamento, que además comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista del receptor del factor endotelial vascular (EGFR).
25. El anticuerpo de la reivindicación 10 para su uso como medicamento, que además comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFR).

26. El anticuerpo de la reivindicación 11 para su uso como medicamento, que además comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGFR).

FIG. 1

Vectores de clonación para expresión de genes de inmunoglobulina



pGS-11F8

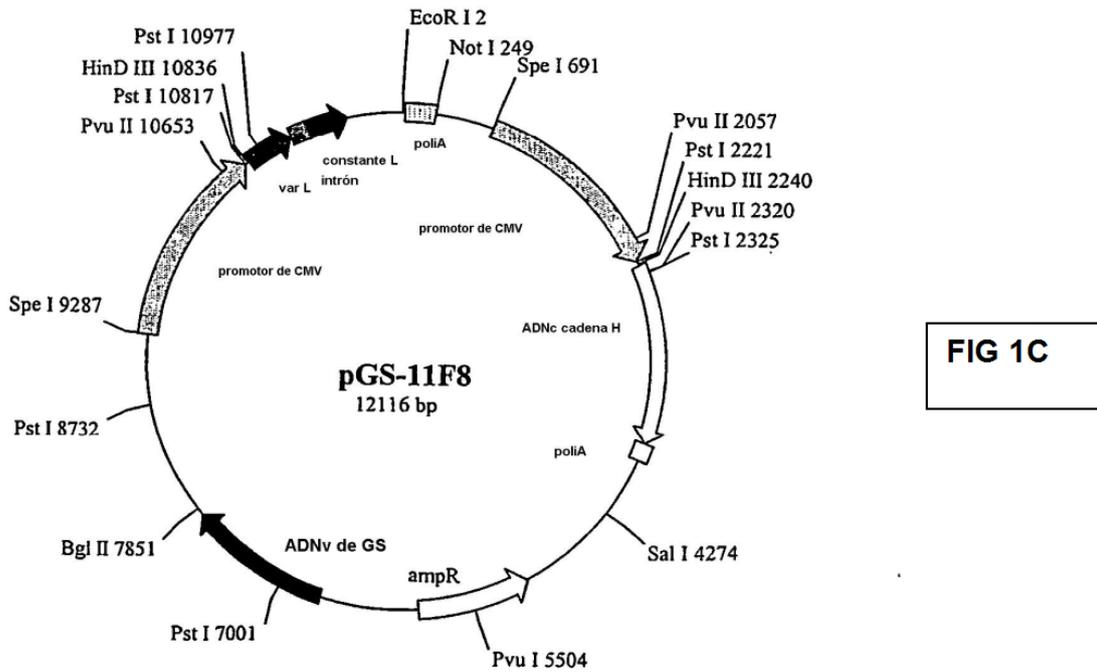


FIG. 2

Perfil de la digestión de restricción de pGS-11F8

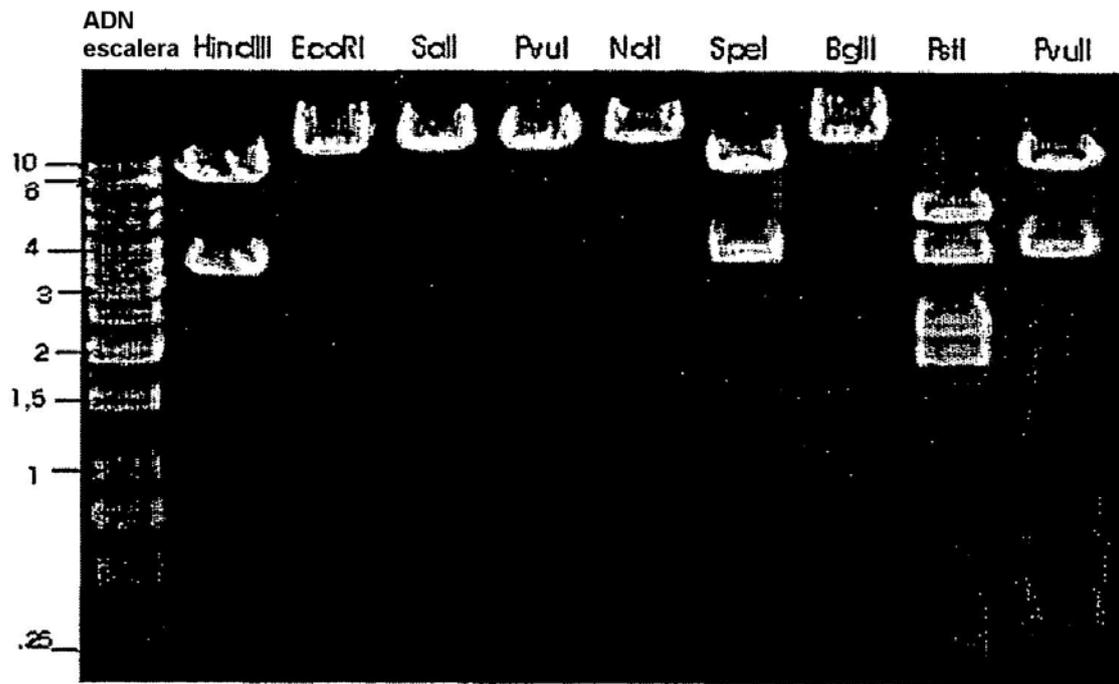


FIG. 3

Unión a EGFR analizada mediante ELISA

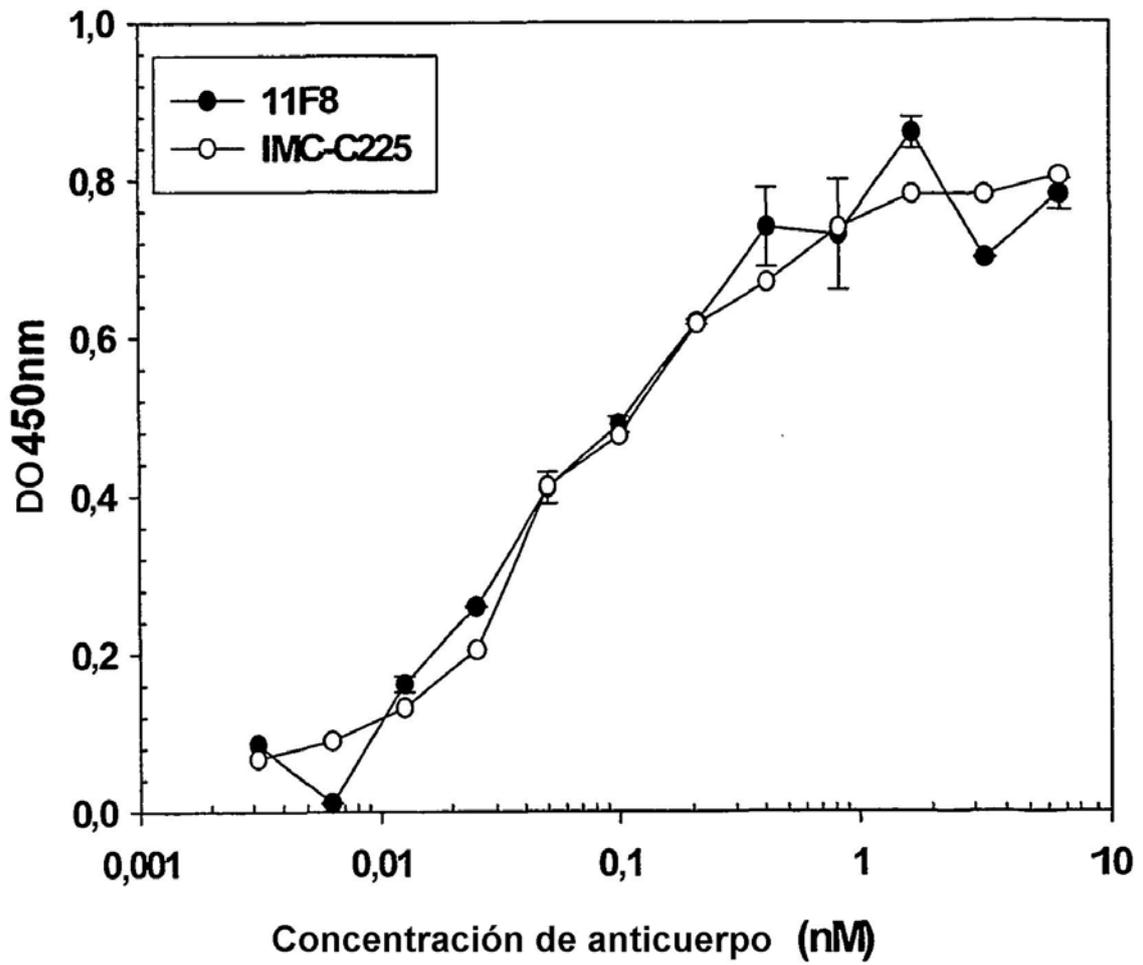


FIG. 4

Inhibición de la unión de ^{125}I -EGF a EGFR en células HT29cells

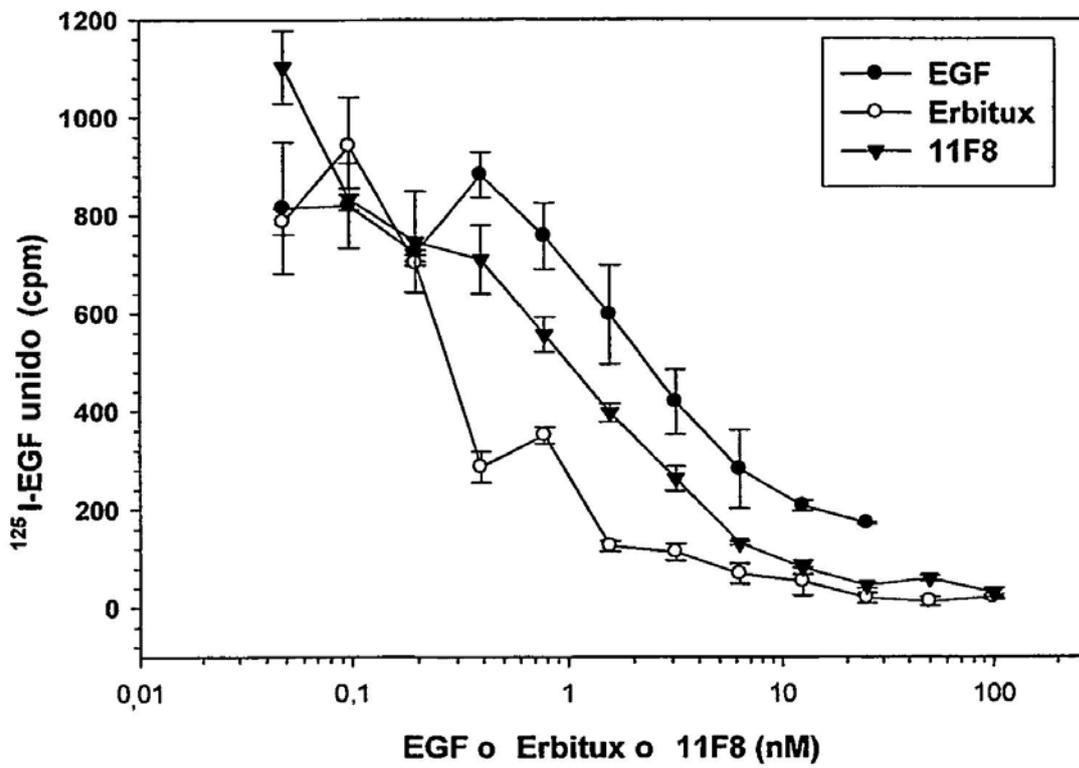


FIG. 5

Inhibición de la fosforilación de EGFR en células BxPC3

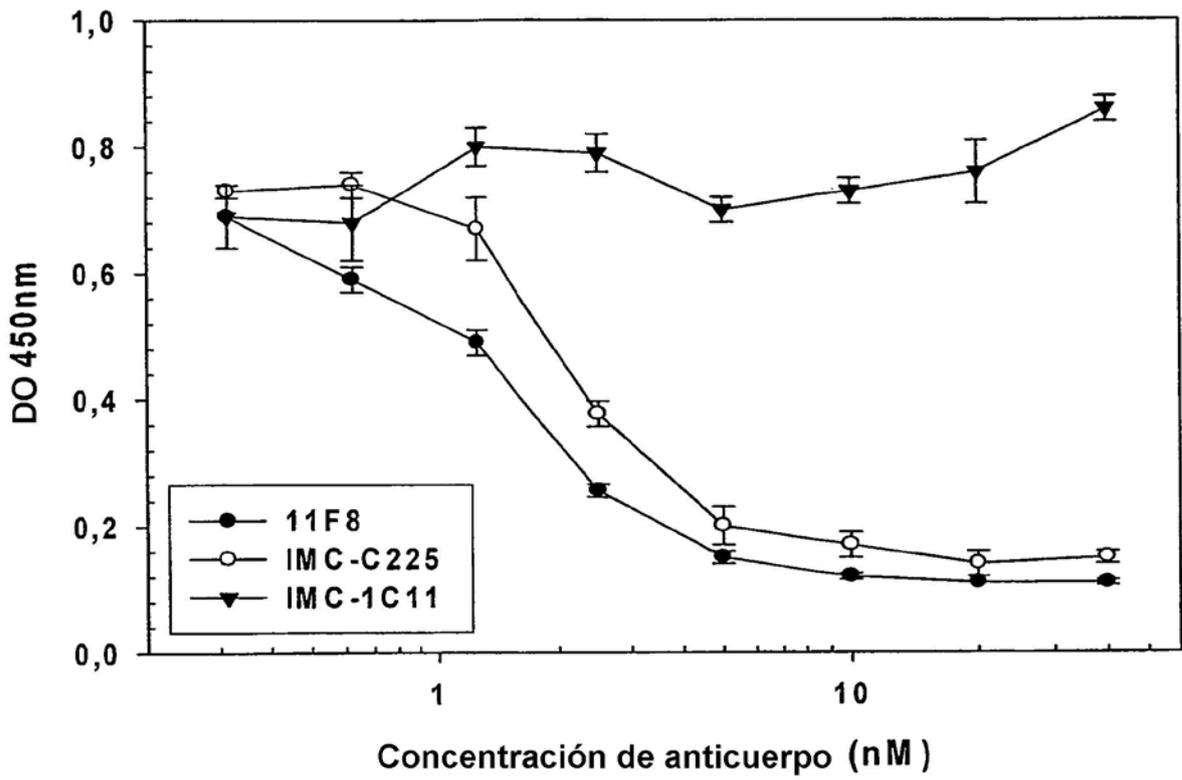


FIG. 6

Inhibición de la fosforilación de EGFR en células A431

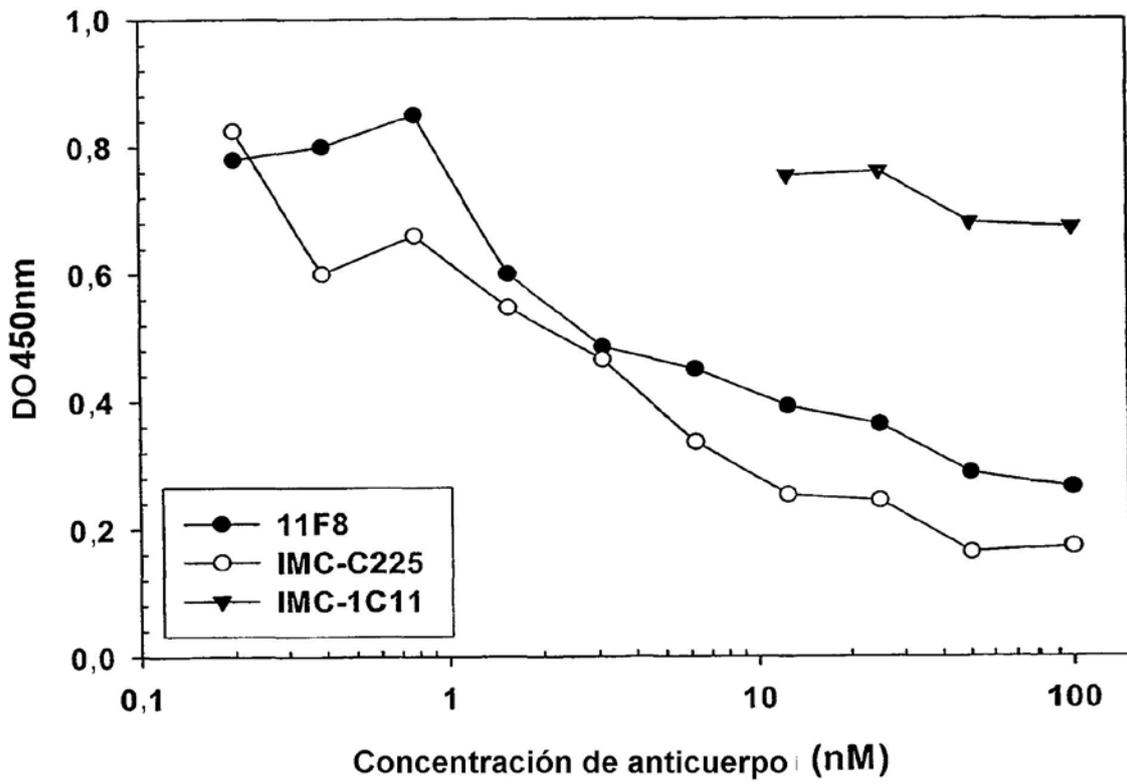


FIG. 7

Inhibición de la fosforilación de EGFR en A431

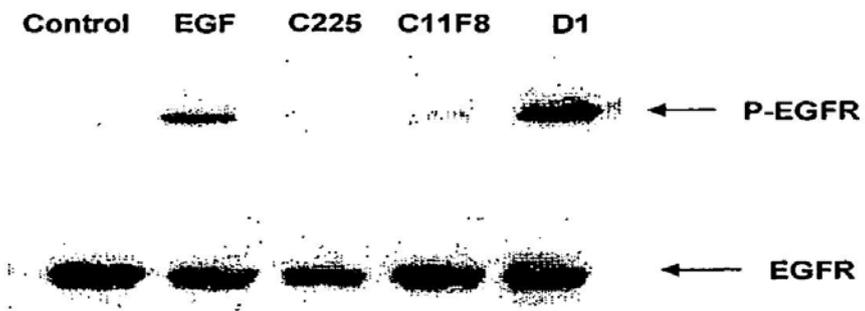


FIG. 7A

FIG. 7B

FIG. 8

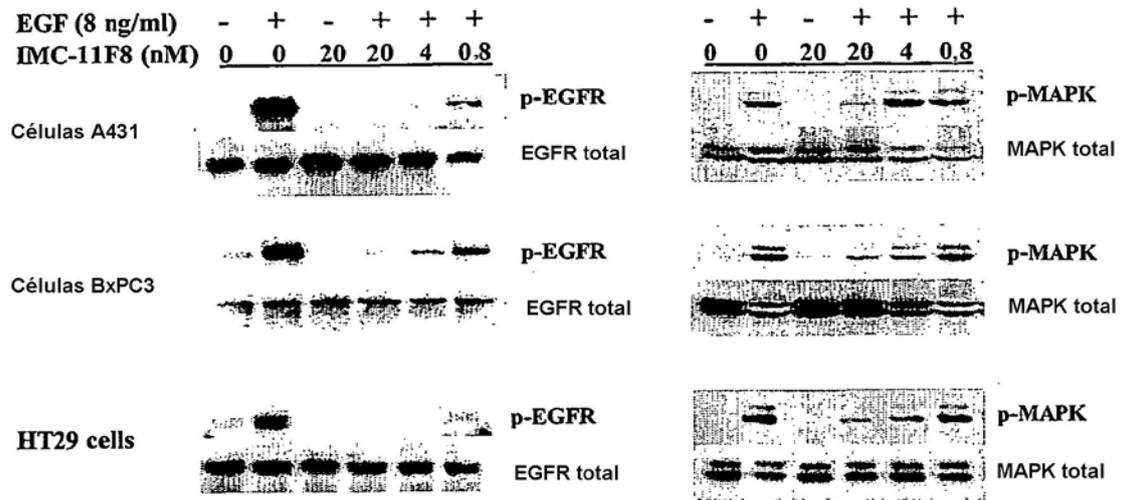


FIG. 9

Inhibición de la proliferación de células DiFi

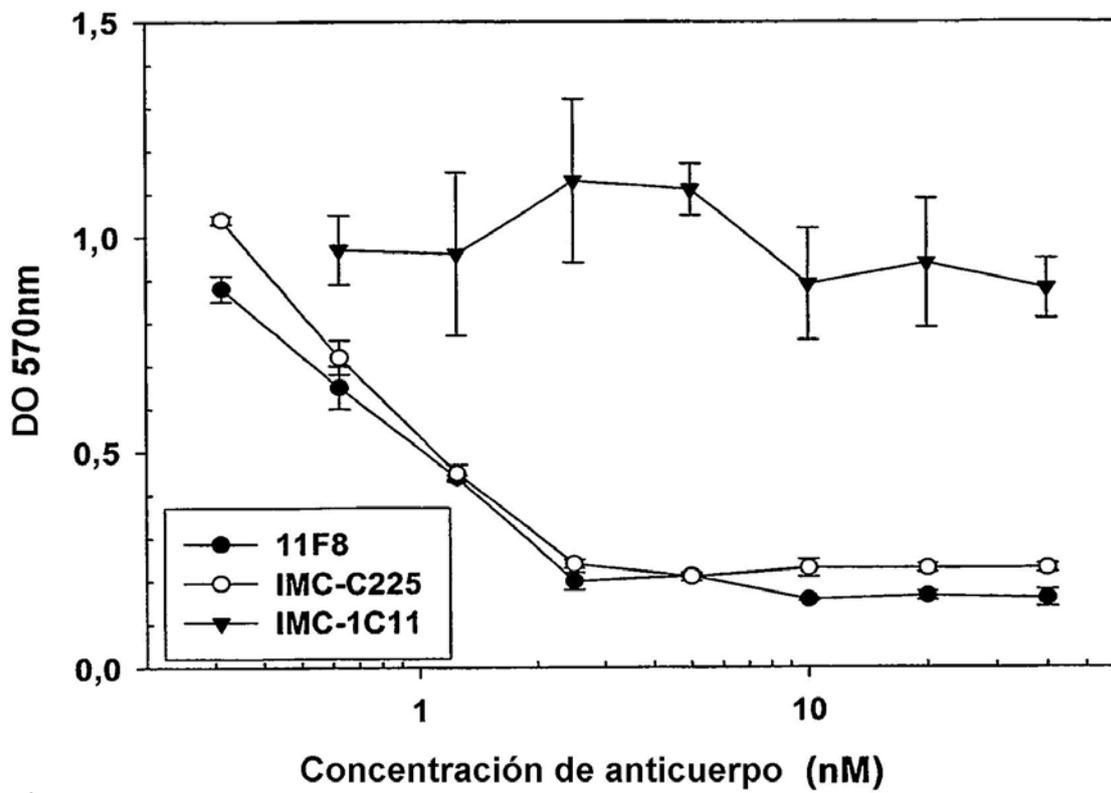
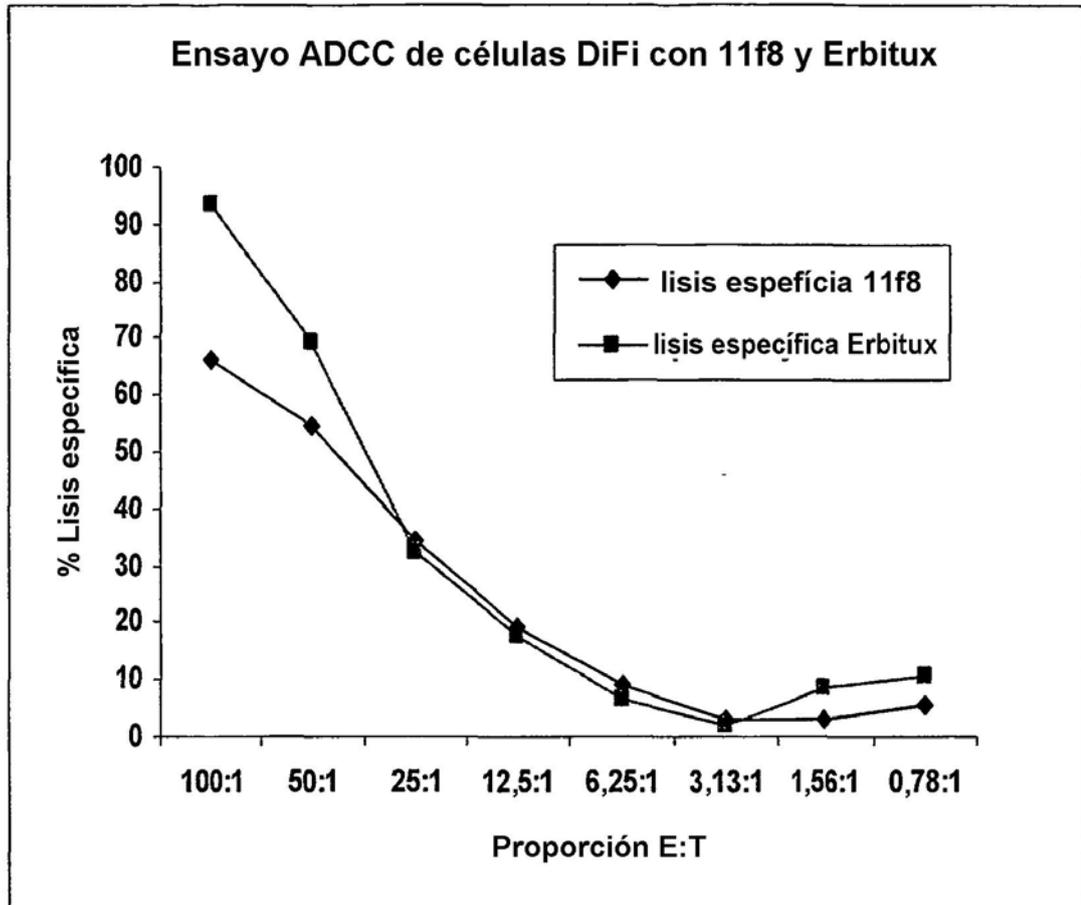


FIG. 10



Actividad antitumoral de IMC-11F8 en comparación con Cetuximab en un modelo de xenoinjerto A431

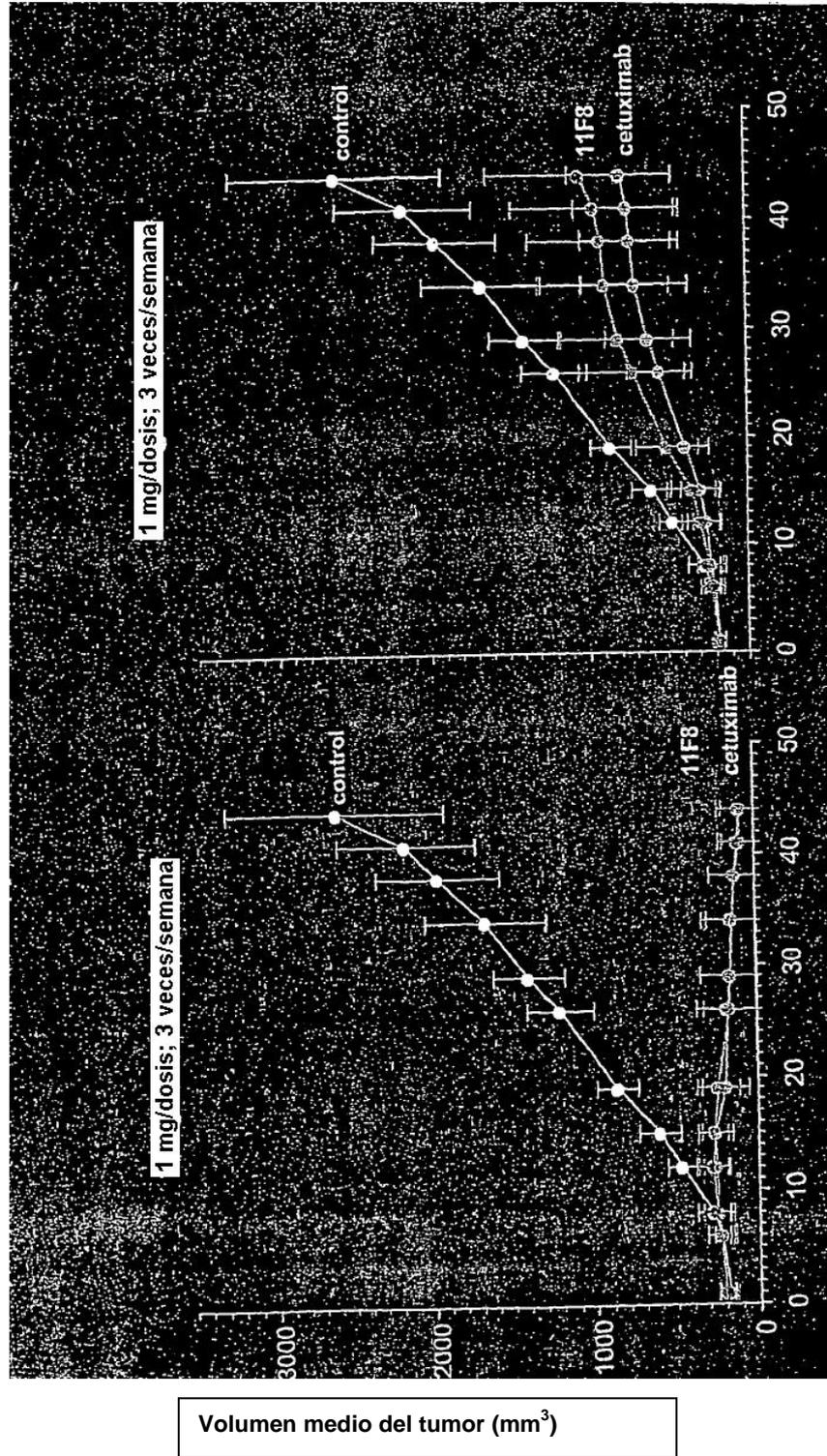


FIG. 11

Actividad antitumoral de IMC-11F8 en comparación Cetuximab en un modelo de xenoinjerto BxPC-3

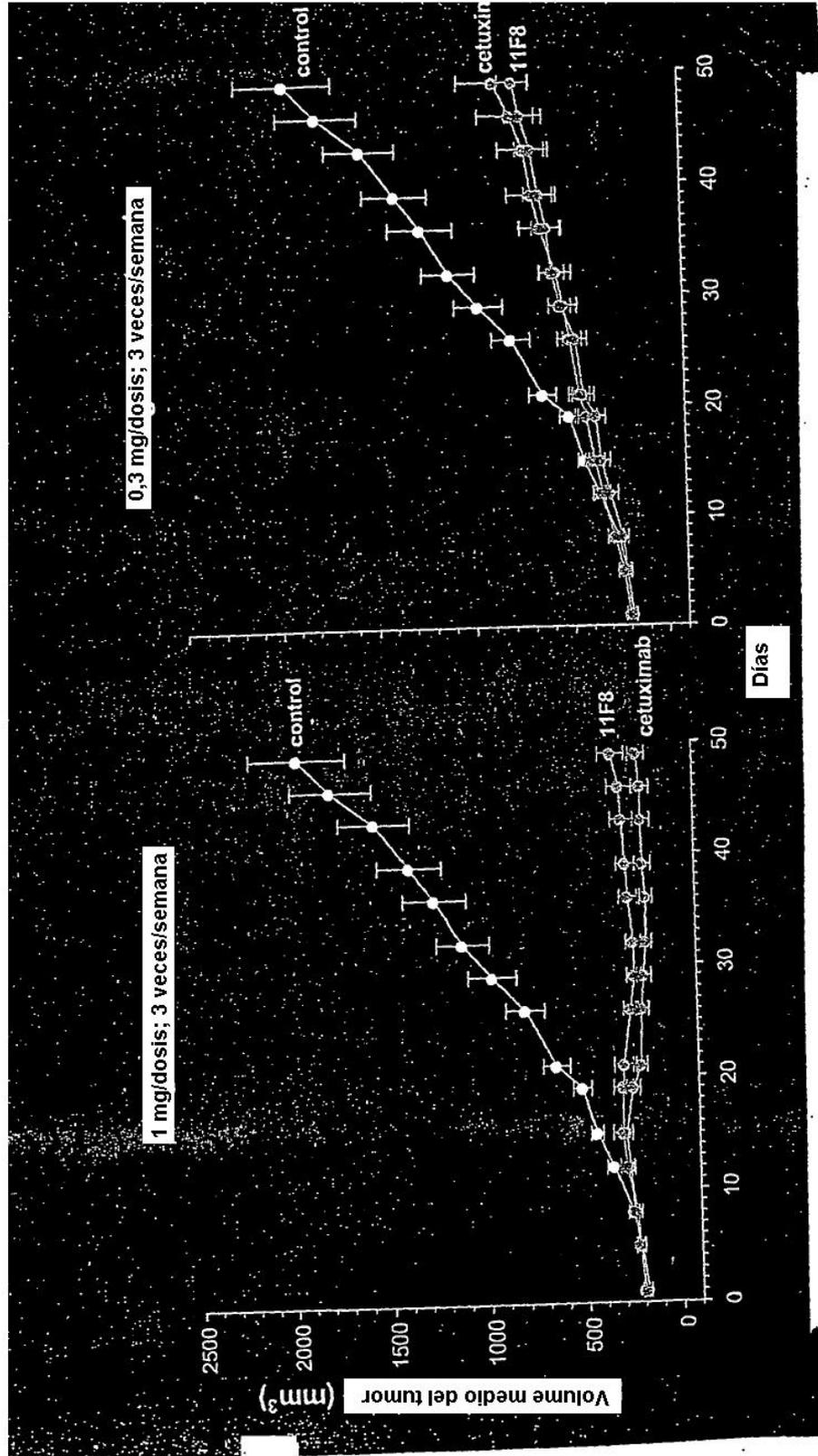


Fig. 12

Figura 13

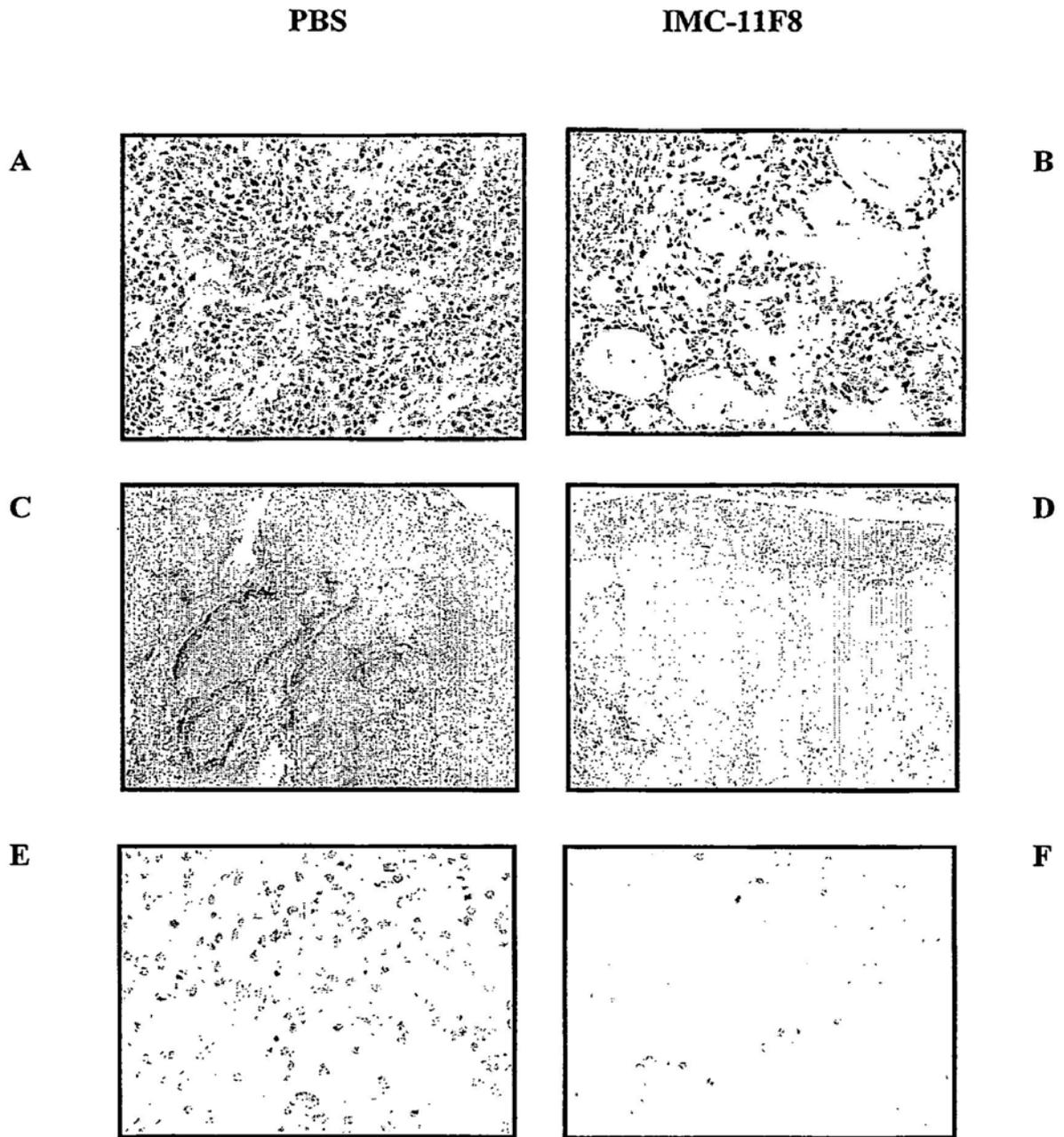
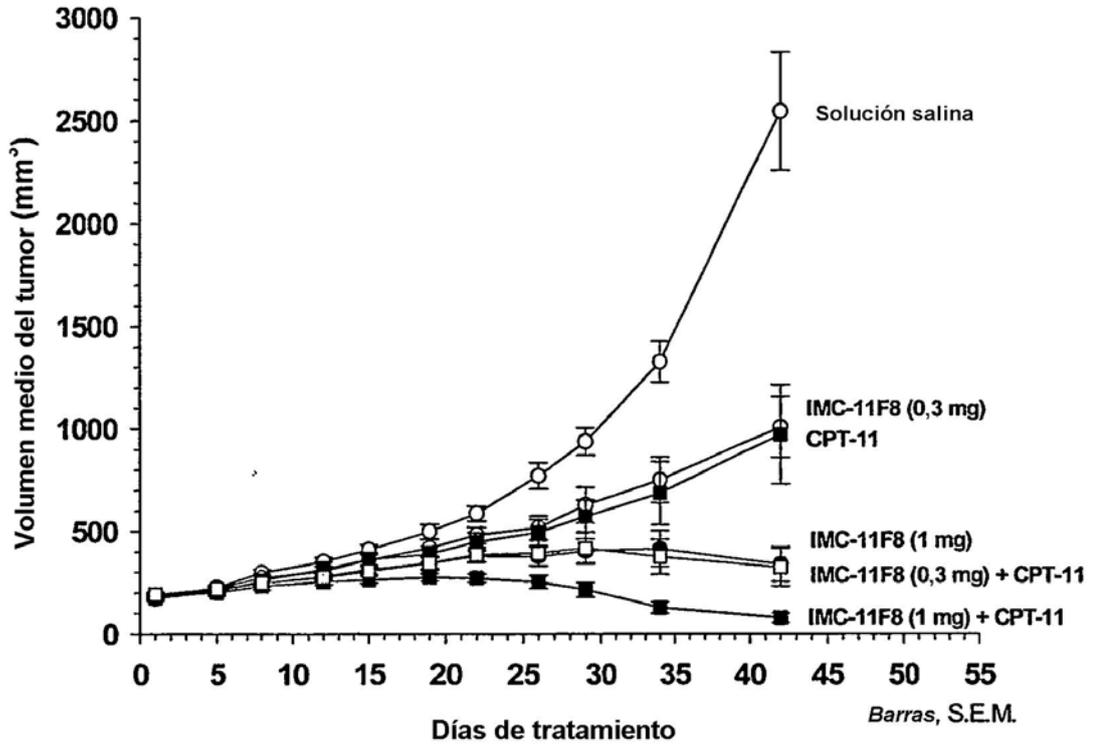
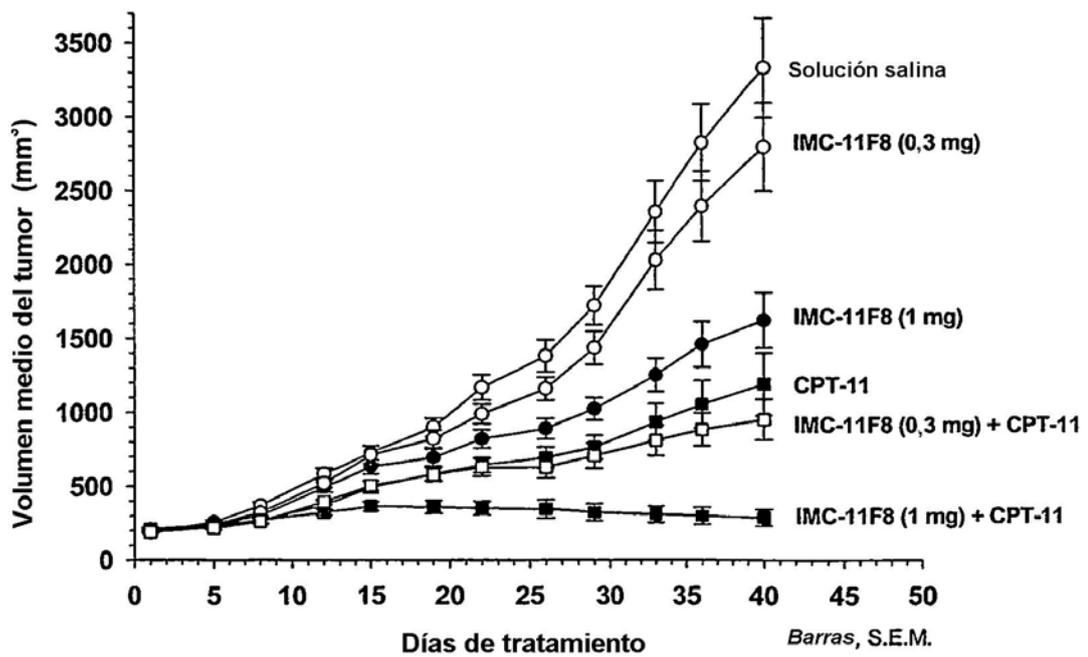


Figura 14

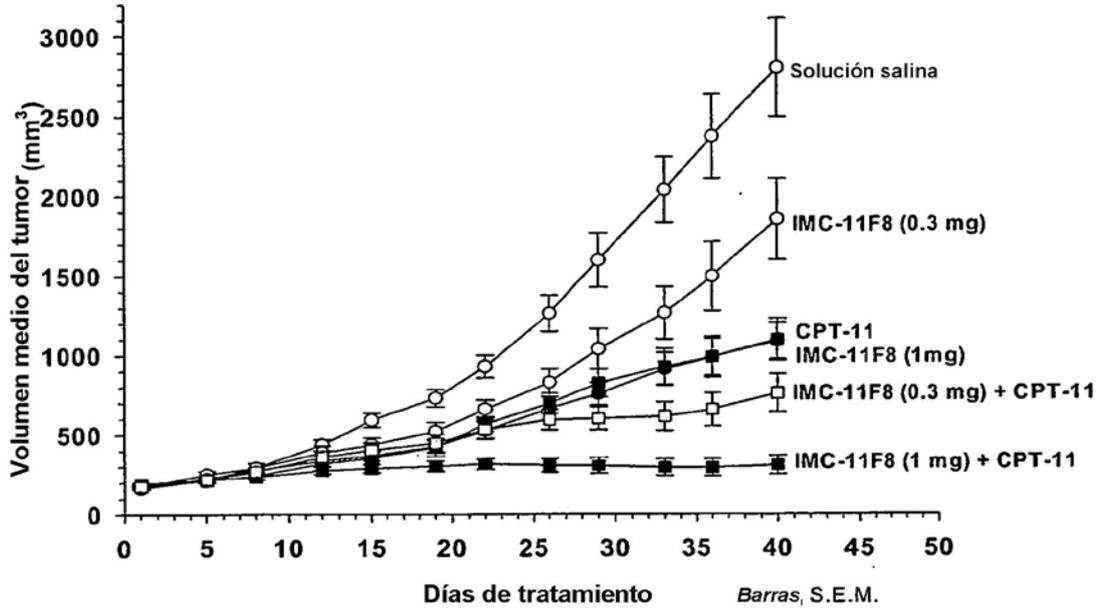
A



B



C



D

