

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 388**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.08.2007** **E 07825698 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2013** **EP 2057192**

54 Título: **Moléculas de unión a antígeno que se unen a EGFR, vectores que los codifican, y usos de los mismos**

30 Prioridad:

09.08.2006 US 836371 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

01.10.2013

73 Titular/es:

**GLYCART BIOTECHNOLOGY AG (100.0%)
WAGISTRASSE 18
8952 SCHLIEREN (ZÜRICH), CH**

72 Inventor/es:

**UMANA, PABLO y
MOSSNER, EKKEHARD**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 424 388 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

Moléculas de unión a antígeno que se unen a EGFR, vectores que los codifican, y usos de los mismos

5 Antecedentes de la invención

Campo de la Invención

10 La presente invención está relacionada con un anticuerpo humanizado que se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR), en el que dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 128, Id. de Sec. N°:1.29, Id. de Sec. N°:131, Id. de Sec. N°:133, Id. de Sec. N°:134, Id. de Sec. N°:136, e Id. de Sec. N°:138, y una región variable de cadena ligera seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°:139, Id. de Sec. N°:140, Id. de Sec. N°:143, Id. de Sec. N°:144, Id. de Sec. N°:145, Id. de Sec. N°:146 e Id. de Sec. N°:147, en el que dicho anticuerpo
15 comprende una región Fc y en el que dicho anticuerpo ha sido glicosmodificado: (i) para tener un porcentaje mayor de oligosacáridos bisectados en la región Fc en comparación con el correspondiente anticuerpo no glicosmodificado, (ii) para tener un número reducido de residuos de fucosa en la región Fc en comparación con el correspondiente anticuerpo no glicosmodificado, (iii) para tener una afinidad mayor de unión al receptor Fc en comparación con un correspondiente anticuerpo no glicosmodificado, y/o (iv) para tener una mayor función efectora en comparación con un correspondiente anticuerpo no glicosmodificado, en el que los puntos (i) a (iv) resultan de una actividad aumentada de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT III) en una célula huésped que expresa un polipéptido que reduce a la mitad dicha actividad.

25 La descripción en general está relacionada con moléculas de unión a antígeno (ABM). En realizaciones particulares, la descripción está relacionada con anticuerpos monoclonales recombinantes, incluyendo anticuerpos quiméricos, privatizados o humanizados específicos para el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR). Además, la descripción está relacionada con moléculas de ácido nucleico que codifican dichas ABM, y vectores y células huésped que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico. La descripción además está relacionada con métodos para producir las ABM descritas en este documento, y composiciones que comprenden estas ABM para
30 utilizar en el tratamiento de una enfermedad. Además, la descripción está relacionada con ABM con glicosilación modificada que tiene propiedades terapéuticas mejoradas, que incluye anticuerpos con aumento de la unión al receptor Fc y aumento de la función efectora.

Antecedentes

35 EGFR y anticuerpos anti-EGFR

El receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (también conocido como HER-1 o Erb-B1, y referido en este documento como "EGFR") es un receptor transmembrana de 170 kDa codificado por el c protooncogén -erbB, y
40 presenta una actividad tirosina quinasa intrínseca (Modjtahedi et al., Br. J. Cancer 73:228-235 (1996); Herbst y Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002)). La entrada de la base de datos SwissProt P00533 proporciona la secuencia de EGFR. Existen también isoformas y variantes de EGFR (por ejemplo, transcritos de RNA alternativos, versiones truncadas, polimorfismos; etc.) que incluyen pero no se limitan a aquellos identificados por los números de entrada de la base de datos SwissProt P00533-1, P00533-2, P00533-3, y P00533-4. EGFR se conoce por unirse a ligandos
45 que incluyen el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento transformante- α (TGF- α), amfiregulina, EGF de unión a heparina (hb-EGF), betacelulina, y epiregulina (Herbst y Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002); Mendelsohn y Haselga, Oncogene 19: 6550-6565 (2000)). EGFR regula numerosos procesos celulares mediante las rutas de transducción de señales mediadas por tirosina quinastas, que incluyen, pero no se limitan a, activación de las rutas de transducción de señales que controlan la proliferación celular, diferenciación, supervivencia celular, apoptosis, angiogénesis, mitogénesis, y metástasis (Atalay et al., Ann. Oncology 14:1346-1363 (2003); Tsao y Herbst, Signal 4:4-9 (2003); Herbst y Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002); Modjtahedi et al., Br. J. Cancer 73:228-235 (1996)).

La sobreexpresión de EGFR se ha descrito en muchas enfermedades malignas humanas, que incluye cáncer de vejiga, cerebro, cabeza y cuello, páncreas, pulmón, mama, ovario, colon, próstata, y riñón. (Atalay et al., Ann. Oncology 14:1346-1363 (2003); Herbst y Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002) Modjtahedi et al., Br. J. Cancer 73:228-235 (1996)). En muchas de estas enfermedades, la sobreexpresión de EGFR se correlaciona o se asocia con un pronóstico pobre de los pacientes. (Herbst y Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002); Modjtahedi et al., Br. J. Cancer 73:228-235 (1996)). EGFR también se expresa en las células de tejidos normales, en particular los tejidos epiteliales de la piel, hígado, y tracto gastrointestinal, aunque en niveles generalmente inferiores que en las células malignas (Herbst y Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002)).

Los anticuerpos monoclonales no conjugados (mAb) pueden ser medicinas útiles para el tratamiento del cáncer, tal como se demuestra por la aprobación de la U.S. Food and Drug Administration del Trastuzumab (Herceptin™; Genentech Inc.) para el tratamiento de cáncer de mama avanzado (Grillo-Lopez, A.-J., et al. Semin. Oncol. 26:66-73 (1999); Goldenberg, M. M., Clin. Ther. 21:309-18 (1999)), Rituximab (Rituxan™; IDEC Pharmaceuticals, San Diego,

CA, y Genentech Inc., San Francisco, CA), para el tratamiento de linfocitos B CD20 positivos, linfoma no Hodgkin de bajo grado o folicular, Gemtuzumab (Mylotarg™, Celltech/Weth-Ayerst) para el tratamiento de la recaída de la leucemia mieloide aguda, y Alemtuzumab (CAMPATH™, Millenium Pharmaceuticals/Schering AG) para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica de linfocitos B. El éxito de estos productos no solo se debe a su eficacia sino también en sus excelentes perfiles de seguridad (Grillo-Lopez, A.J., et al., *Semin. Oncol.* 26:66-73 (1999); Goldenberg, M. M., *Clin. Ther.* 21:309-18 (1999)). A pesar de los logros de estos medicamentos, en la actualidad existe un gran interés en obtener mayor actividad de anticuerpo específico de lo que normalmente proporciona la terapia de un mAb conjugado.

Los resultados de una serie de estudios sugieren que los mecanismos dependientes de receptor de Fc contribuyen sustancialmente a la acción de los anticuerpos citotóxicos contra los tumores e indican que un anticuerpo óptimo contra los tumores se uniría preferentemente a los receptores de activación de Fc y mínimamente a la pareja inhibidora FcγRTTB. (Clynes, R. A., et al., *Nature Medicine* 6(4):443-446 (2000); Kalgis, A.M., y Ravetch, J. V., *J. Exp. Med.* 195(12):1653-1659 (junio de 2002). Por ejemplo, los resultados de por lo menos un estudio sugieren que el polimorfismo en el receptor de FcR1IIa, en particular, se asocia fuertemente con la eficacia de la terapia de anticuerpo (Cartron, G., et al., *Blood* 99 (3): 754-757 (febrero de 2002)). Este estudio demostró que los pacientes homocigotos para FcR1IIa tienen una mejor respuesta al rituximab que los pacientes heterocigotos. Los autores concluyeron que la superior respuesta se debía a una mejor unión in vivo del anticuerpo a FcγR1II2, lo que resultó en una mejor actividad CCDA contra las células del linfoma. (Cartron, G., et al., *Blood* 99 (3):754-757 (febrero de 2002)).

Se han descrito varias estrategias para detectar EGFR y bloquear las rutas de señalización del EGFR. Los inhibidores tirosina quinasa de moléculas pequeñas, como gefitinib, erlotinib, y C1-1033 bloquean la autofosforilación de EGFR en la región intracelular tirosina quinasa, inhibiendo con ello los eventos de señalización corriente abajo (Tsao y Herbst, *Señal* 4: 4-9 (2003)). Los anticuerpos monoclonales, por otro lado, se dirigen a la porción extracelular de EGFR, lo que resulta en el bloqueo de la unión del ligando y de este modo inhibe los procesos corriente abajo, tales como la proliferación celular (Tsao y Herbst, *Signal* 4: 4-9 (2003)).

Se han generado varios anticuerpos monoclonales murinos que logran un bloqueo de este tipo in vitro y que han sido evaluados para determinar su capacidad para afectar el crecimiento del tumor en modelos de xenoinjertos de ratón (Masui, et al., *Cancer Res.* 46: 5592-5598 (1986); Masui, et al., *Cancer Res.* 44:1002-1007 (1984); Goldstein, et al., *Clin. Cancer Res.* 1: 1311-1318 (1995)). Por ejemplo, EMD 55900 (EMD Pharmaceuticals) es un anticuerpo monoclonal anti-EGFR murino que se produjo contra la línea celular A431 de carcinoma epidermoide humano y se puso a prueba en estudios clínicos de pacientes con carcinoma avanzado de células escamosas de la laringe o hipofaringe (Bier et al., *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 252:433-9 (1995)). Además, los anticuerpos monoclonales ICR16, ICR62, e ICR80 de rata, que se unen al dominio extracelular de EGFR, han demostrado ser eficaces en la inhibición de la unión de EGF y TGF-α al receptor. (Modjtahedi et al., *Int. J. Cancer* 75:310-316 (1998)). El anticuerpo monoclonal murino 425 es otro MAb que se produjo en contra de la línea de células de carcinoma humano A431 y se encontró que se une a un epítipo de polipéptido en el dominio externo del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano. (Murthy et al., *Arch. Biochem Biophys.* 252 (2): 549-560 (1987)). Un problema potencial con el uso de anticuerpos murinos en los tratamientos terapéuticos es que los anticuerpos monoclonales no humanos pueden ser reconocidos por el huésped humano como una proteína extraña, por lo tanto, la inyección repetida de tales anticuerpos extraños puede conducir a la inducción de respuestas inmunes que conducen a reacciones de hipersensibilidad dañinas. Para los anticuerpos monoclonales murinos, esto se conoce como una respuesta de anticuerpo anti-ratón humano, o respuesta "HAMA", o una respuesta de anticuerpo anti-rata humano, o respuesta "HARA". Además, estos anticuerpos "extraños" pueden ser atacados por el sistema inmune del huésped de manera que son, en efecto, neutralizados antes de que lleguen a su lugar de destino. Además, los anticuerpos monoclonales no humanos (por ejemplo, los anticuerpos monoclonales murinos) normalmente carecen de funcionalidad efectora humana, es decir, no son capaces de, entre otras cosas, mediar la lisis dependiente de complemento o lisar células diana humanas a través de la toxicidad celular dependiente de anticuerpo o fagocitosis mediada por el receptor Fc.

Los anticuerpos quiméricos que comprenden porciones de anticuerpos de dos o más especies diferentes (por ejemplo, ratón y humano) se han desarrollado como alternativa a los anticuerpos conjugados. Por ejemplo, la patente EE.UU. N° 5.891.996 (Mateo de Acosta del Rio et al.) describe un anticuerpo quimérico ratón/humano, R3, dirigido contra EGFR, y la patente EE.UU. N° 5.558.864 describe la generación de formas quiméricas y humanizadas del MAb 425 anti-EGFR murino. También, IMC-C225 (Erbix®; ImClone) es un anticuerpo monoclonal quimérico ratón/humano anti-EGFR (basado en el anticuerpo monoclonal M225 de ratón, que resulta en las respuestas HAMA en los ensayos clínicos humanos) que se han descrito para demostrar la eficacia antitumoral en varios modelos de xenoinjerto humano. (Herbst y Shin, *Cancer* 94:1593-1611 (2002)). La eficacia de IMC-C225 se ha atribuido a varios mecanismos, que incluyen la inhibición de eventos celulares regulados mediante las rutas de señalización de EGFR, y posiblemente mediante el aumento de la actividad de la toxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) (Herbst y Shin, *Cancer* 94: 1593-1611 (2002)). IMC-C225 también se utilizó en ensayos clínicos, que incluye en combinación con radioterapia y quimioterapia (Herbst y Shin, *Cancer* 94:1593-1611 (2002)). Recientemente, Abgenix, Inc. (Fremont, CA) desarrolló ABX-EGF para la terapia contra el cáncer. ABX-EGF es un anticuerpo monoclonal anti-EGFR completamente humano. (Yang et al., *Crit. Rev. Oncol./Hematol.* 38: 17-23 (2001)).

Glicosilación de anticuerpos

El componente de oligosacárido puede afectar significativamente las propiedades relevantes a la eficacia de una glicoproteína terapéutica, que incluye estabilidad física, resistencia al ataque de proteasas, las interacciones con el sistema inmunológico, la farmacocinética, y la actividad biológica específica. Tales propiedades pueden depender no sólo de la presencia o ausencia, sino también de las estructuras específicas, de oligosacáridos. Se pueden hacer algunas generalizaciones entre la estructura de oligosacárido y la función de la glicoproteína. Por ejemplo, determinadas estructuras de oligosacárido median en la rápida eliminación de la glicoproteína de la circulación sanguínea a través de interacciones con proteínas específicas de unión a hidratos de carbono, mientras que otros pueden unirse mediante anticuerpos y desencadenar reacciones inmunes no deseadas. (Jenkins et al., *Nature Biotechnol.* 14:975-81 (1996)).

Las células de mamífero son los huéspedes preferidos para la producción de glicoproteínas terapéuticas, debido a su capacidad de glicosilar proteínas en la forma más compatible para la aplicación en humanos. (Cumming et al., *Glycobiology* 1:115-30 (1991); Jenkins et al., *Nature Biotechnol.* 14:975-81 (1996)). Las bacterias muy raramente glicosilan proteínas, y como otros tipos de huéspedes comunes, como levaduras, hongos filamentosos, insectos y células de plantas, proporcionan patrones de glucosilación asociados con un rápido aclaramiento de la corriente sanguínea, interacciones inmunes no deseadas, y en algunos casos específicos, reducción de la actividad biológica. Entre las células de mamífero, las células de ovario de hámster chino (CHO) se han utilizado con mayor frecuencia durante las dos últimas décadas. Además de proporcionar pautas de glicosilación adecuadas, estas células permiten la generación constante de líneas celulares clonales genéticamente estables, de alta productividad. Estas pueden cultivarse a altas densidades en biorreactores sencillos utilizando medio libre de suero, y permiten el desarrollo de bioprocesos seguros y reproducibles. Otras células animales comúnmente utilizadas incluyen células de riñón de hámster recién nacido (BHK), y células de mieloma de ratón NSO SP2/O. Más recientemente, la producción a partir de animales transgénicos también se ha probado. (Jenkins et al., *Nature Biotechnol.* 14:975-81 (1996)).

Todos los anticuerpos contienen estructuras de carbohidrato en posiciones conservadas en las regiones constantes de la cadena pesada, con cada isotipo que posee una disposición distinta de las estructuras de carbohidratos N-ligadas, que afectan de forma variable el ensamblaje de proteínas, la actividad funcional o la secreción. (Wright, A., y Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15:26-32 (1997)). La estructura de los carbohidratos unidos N-ligados varía considerablemente, dependiendo del grado de procesamiento, y puede incluir alta manosa, oligosacáridos multiramificados así como complejos biantenarios. (Wright, A., y Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15:26-32 (1997)). Normalmente, existe un procesamiento heterogéneo del núcleo de las estructuras del oligosacárido unidas a un sitio de glicosilación particular de forma que incluso los anticuerpos monoclonales existen con múltiples glicoformas. De forma similar, se ha demostrado que las principales diferencias en la glicosilación del anticuerpo ocurre entre las líneas celulares, y se observan incluso diferencias menores para una línea celular determinada crecida bajo diferentes condiciones de cultivo. (Lifely, M. R. et al., *Glycobiology* 5(8):813-22 (1995)).

Una manera de obtener grandes incrementos de potencia, manteniendo al mismo tiempo un proceso de producción simple y evitando potencialmente efectos secundarios no deseados significativos, es aumentar las funciones efectoras naturales, mediadas por células de los anticuerpos monoclonales mediante ingeniería de su componente oligosacárido tal como se describe en Umaña, P. et al., *Nature Biotechnol.* 17: 176-180 (1999) y patente EE.UU. N° 6.602.684. Los anticuerpos de tipo IgG1, los anticuerpos más comúnmente utilizados en la inmunoterapia del cáncer, son glicoproteínas que tienen un sitio de glicosilación conservado N-ligado en Asn297 en cada dominio CH2. Los dos complejos de oligosacáridos biantenarios unidos a Asn297 se encuentran enterrados entre los dominios CH2, formando extensos contactos con la columna vertebral del polipéptido, y su presencia es esencial para el anticuerpo para mediar funciones efectoras tales como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) (Lifely, M. R., et al., *Glycobiology* 5:813-822 (1995); Jefferis, R., et al., *Immunol Rev.* 163:59-76 (1998); Wright, A. y Morrison, S. L., *Trends Biotechnol.* 15:26-32 (1997)).

Umaña et al. mostró anteriormente que la sobreexpresión de β (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III ("GnTIII") en células ovario de hámster chino (CHO), una glicosiltransferasa que cataliza la formación de oligosacáridos bisectados, aumenta significativamente la actividad CCDA in vitro de un anticuerpo monoclonal quimérico anti-neuroblastoma (chCE7) producido por las células CHO modificadas. (Ver Umaña, P. et al., *Nature Biotechnology*, 17:176-180 (1999); y publicación Internacional N° WO 99/54342). El anticuerpo chCE7 pertenece a una clase grande de mAbs no conjugados que tienen alta afinidad y especificidad por el tumor, pero tienen muy poca potencia para ser clínicamente útiles cuando se producen en las líneas celulares industriales estándar sin la enzima GnTIII (Umaña, P., et al., *Naturaleza Biotechnol.* 17:176-180 (1999)). Ese estudio fue el primero en demostrar que un gran aumento de la actividad CCDA podrían obtenerse a través de la modificación de células productoras de anticuerpo para expresar GnTIII, que también dio lugar a un aumento de la proporción de oligosacáridos bisectados asociados a (Fc), en la región constante, que incluye oligosacáridos bisectados, no fucosilados, por encima de los niveles que se encuentran en los anticuerpos que aparecen de forma natural.

Ese estudio fue el primero en demostrar que un gran aumento de la actividad CCDA podrían obtenerse a través de la modificación de las células productoras de anticuerpo para expresar GnTIII, que también conducen a un aumento en la proporción de oligosacáridos bisectados asociados a (Fc), en la región constante, que incluye oligosacáridos

bisectados, no fucosilados, por encima de los niveles que se encuentran en los anticuerpos que aparecen de forma natural.

5 Sigue existiendo una necesidad de enfoques terapéuticos mejorados dirigidos a EGFR para el tratamiento de los trastornos de proliferación celular en los primates, que incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, en el que tales trastornos se caracterizan por la expresión de EGFR, particularmente la expresión anormal (por ejemplo, la sobreexpresión) que incluyen, pero no se limitan a, cáncer de vejiga, cerebro, cabeza y cuello, páncreas, pulmón, mama, ovario, colon, próstata, y riñón. En particular, sigue habiendo una necesidad de reducir al mínimo el número de residuos no humanos en moléculas de unión a antígeno administradas a sujetos humanos.

10 Breve resumen de la invención

15 Reconociendo el enorme potencial terapéutico de las moléculas de unión a antígeno (ABM) que tiene la especificidad de unión del anticuerpo de rata ICR62 (por ejemplo, unirse al mismo epítipo) y que han sido glicomodificado para mejorar la afinidad de unión al receptor Fc y la función efectora, se ha desarrollado un método para producir dichos ABM. Entre otras cosas, este método implica la producción de anticuerpos quiméricos recombinantes, o fragmentos quiméricos de los mismos. La eficacia de estas ABM se mejora aún más mediante la modificación del perfil de glicosilación de la región Fc del anticuerpo. La invención está relacionada con los siguientes anticuerpos humanizados anti-EGFR, células huésped Y métodos párrafo producir un anticuerpo que es capaz de competir con el anticuerpo monoclonal de rata ICR62 para la unión al EGFR humano:

25 [1] Un anticuerpo anti-EGFR humanizado que se une específicamente a EGFR humano, en el que dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 128, Id. de Sec. N°:129, Id. de Sec. N°:131, Id. de Sec. N°:133, Id. de Sec. N°: 134, Id. de Sec. N°: 136, e Id. de Sec. N°: 138; y una región variable de cadena ligera seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 139, Id. de Sec. N°:140, Id. de Sec. N°: 143, Id. de Sec. N°: 144, Id. de Sec. N°: 145, Id. de Sec. N°: 146, e Id. de Sec. N°:147, en el que dicho anticuerpo comprende una región Fc y en el que dicho anticuerpo ha sido glicomodificado:

- 30 (a) para tener un aumento del porcentaje de oligosacáridos bisectados en la región Fc en comparación con un correspondiente anticuerpo no glicomodificado,
- (b) para tener un número reducido de residuos de fucosa en la región Fc en comparación con el correspondiente anticuerpo no glicomodificado,
- (c) para tener un aumento en la afinidad de unión al receptor Fc en comparación con el correspondiente anticuerpo no glicomodificado, y/o
- 35 (d) para tener un aumento en la función efectora en comparación con el correspondiente anticuerpo no glicomodificado,

40 en el que los puntos (a) a (d) resultan de un aumento en la actividad $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT III) en una célula huésped que expresa un polipéptido que tiene dicha actividad.

45 [2] El anticuerpo de [1], en el que el aumento en la función efectora se selecciona del grupo que consiste en: aumento de la Citotoxicidad celular mediada por Fc, aumento de la unión a células NK, aumento de la unión a macrófagos, aumento de la unión a monocitos, aumento de la unión a células polimorfonucleares, aumento de la apoptosis inducida por señalización directa, aumento de la maduración de células dendríticas, y aumento de la primación de células T.

50 [3] Una célula huésped que comprende un polinucleótido que codifica una región variable de la cadena pesada como se ha definido en [1] y un polinucleótido que codifica una región variable de cadena ligera como se ha definido en [1], o un vector que comprenden dichos polinucleótidos y en el que dicha célula huésped está modificada para expresar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que posee actividad $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT III).

[4] La célula huésped de [3], en el que dicha célula huésped está modificada además para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que posee actividad manosidasa II.

55 [5] La célula huésped de [3], en el que dicho polipéptido es un polipéptido de fusión que comprende además el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente en Golgi.

60 [6] La célula huésped de [5], en el que dicho dominio de localización Golgi se selecciona del dominio de localización de la manosidasa II, $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I (GnT 1), manosidasa 1, $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II (GnT II), y fucosiltransferasa $\alpha 1-6$ central.

65 [7] Un método para producir un anticuerpo que es capaz de competir con el anticuerpo monoclonal ICR62 de rata para unirse a EGFR humano, en el que dicho anticuerpo monoclonal ICR62 de rata comprende una región variable de la cadena pesada de Id. de Sec. N°:1 y una región variable de cadena ligera de Id. de Sec. N°:43, dicho método comprende:

(a) cultivar la célula huésped de cualquiera de [3] a [6] en un medio bajo condiciones que permiten la expresión de dicho polinucleótido que codifica dicho polipéptido; y
 (b) recuperar dicho anticuerpo en el que dicho anticuerpo comprende una región Fc y en el que dicho anticuerpo ha sido glicosmodificado

- (i) para tener un aumento del porcentaje de oligosacáridos bisectados en la región Fc en comparación con el correspondiente anticuerpo no glicosmodificado,
 (ii) para tener un número reducido de residuos de fucosa en la región Fc en comparación con el correspondiente anticuerpo no glicosmodificado,
 (iii) para tener un aumento de la afinidad de unión al receptor Fc en comparación con el correspondiente anticuerpo no glicosmodificado, y/o
 (iv) para tener un aumento de la función efectora en comparación con el correspondiente anticuerpo no glicosmodificado, en el que los puntos (i) a (iv) resultan de un aumento de la actividad $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT III) en una célula huésped que expresa un polipéptido que posee dicha actividad.

[8] Un anticuerpo anti-EGFR humanizado que se une específicamente a EGFR humano, en el que dicho anticuerpo se produce mediante el método de [7].

[9] Una composición que comprende el anticuerpo de cualquiera de [1], [2] o [8] y un transportador farmacéuticamente aceptable.

[10] El anticuerpo de cualquiera de [1], [2] o [8] para utilizar en el tratamiento de cáncer.

[11] El uso de un anticuerpo de cualquiera de [1], [2] o [8] en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

[12] El anticuerpo de [10] o el uso de [11], en el que dicho cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de riñón, y cáncer de cerebro.

La descripción está dirigida en general a una molécula de unión a antígeno (ABM), que comprende uno o más residuos determinantes de especificidad (SDR) de uno o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal ICR62 de rata, y una secuencia derivada de un polipéptido heterólogo, en el que la ABM se une específicamente a EGFR. En una realización particular, la ABM no comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 3, Id. de Sec. N°: 5, Id. de Sec. N°: 7, Id. de Sec. N°: 9, Id. de Sec. N°: 11, Id. de Sec. N°: 13, Id. de Sec. N°: 15, Id. de Sec. N°: 17, Id. de Sec. N°: 19, Id. de Sec. N°: 21, Id. de Sec. N°: 23, Id. de Sec. N°: 25, Id. de Sec. N°: 27, Id. de Sec. N°: 29, Id. de Sec. N°: 31, Id. de Sec. N°: 33, Id. de Sec. N°: 35, Id. de Sec. N°: 37, Id. de Sec. N°: 39, Id. de Sec. N°: 43, Id. de Sec. N°: 45, Id. de Sec. N°: 49, Id. de Sec. N°: 51, e Id. de Sec. N°: 121.

En una realización, uno o más SDR están en una o más CDR de cadena pesada. En una realización particular, uno o más SDR de cadena pesada está seleccionado de entre el grupo que consiste en fenilalanina en la posición Kabat 29, asparagina en la posición Kabat 52, tirosina en la posición Kabat 56, y valina en la posición Kabat 100b. En otra realización particular, uno o más SDR de cadena pesada comprende una tirosina en la posición Kabat 56 y valina en la posición Kabat 100b. En otra realización particular, uno o más SDR de cadena pesada son fenilalanina en la posición Kabat 29, asparagina en la posición Kabat 52, tirosina en la posición Kabat 56 y valina en la posición Kabat 100b.

En una realización, uno o más SDR están en uno o más CDR de cadena ligera. En una realización particular, uno o más SDR de cadena ligera comprende asparagina en la posición Kabat 50. En otra realización particular, uno o más SDR de cadena ligera comprende asparagina en la posición Kabat 34 y asparagina en la posición Kabat 50.

En otro aspecto, la descripción está dirigida a una ABM que comprende al menos dos CDR del anticuerpo de rata ICR62, o una variante o forma truncada de la misma que contiene al menos los SDR de dichas CDR. En una realización, la ABM comprende al menos tres CDR del anticuerpo de rata ICR62, o una variante o forma truncada del mismo que contiene al menos los SDR de dichas CDR. En otra realización, la ABM comprende al menos cuatro CDR del anticuerpo de rata ICR62, o una variante o forma truncada del mismo que contiene al menos los SDR de dichas CDR. En otra realización, la ABM comprende seis CDR del anticuerpo de rata ICR62, o una variante o forma truncada del mismo que contiene al menos los SDR de dichas CDR. En otra realización, las CDR del anticuerpo de rata ICR62 comprende sustituciones en una o más posiciones de aminoácido, y en el que dicha ABM retiene la actividad de unión en comparación con la ABM no sustituida. En otra realización, las CDR del anticuerpo de rata ICR62 comprenden sustituciones en cualquier posición excepto en los residuos determinantes de la especificidad. En otra realización, las CDR del anticuerpo de rata ICR62 comprenden sustituciones en todas las posiciones excepto para los residuos determinantes de la especificidad. En una realización particular, las CDR comprenden sustituciones en una o más posiciones Kabat 27, 28, o 29 de la CDR1 de la cadena pesada de Chothia, posición

Kabat 31 de la CDR1 de la cadena pesada de Kabat, posiciones Kabat 52, 52a, 53, o 57 de la CDR2 de la cadena pesada de Kabat, o posición Kabat 102 de la CDR3 de la cadena pesada de Kabat. En otra realización particular, las CDR comprenden sustituciones en una o más de las posiciones Kabat 30 o 32 de la CDR1 de la cadena ligera de Kabat, posiciones Kabat 51, 52, 53, o 56 de la CDR2 de la cadena ligera de Kabat, o posición Kabat 94 de la CDR3 de la cadena ligera de Kabat.

En otro aspecto, la descripción está dirigida a ABM en el que la concentración CE50 para la unión está modulada en menos de un factor de aproximadamente 10 a aproximadamente 0,001, en comparación con la ABM no sustituida. En una forma de realización específica, la concentración CE50 está modulada en menos de un factor de aproximadamente 10 a aproximadamente 1, en comparación con la ABM no sustituida. En otra forma de realización específica, la concentración CE50 está modulada en menos de un factor de aproximadamente 10 a aproximadamente 5, en comparación con la ABM no sustituida. En otra forma de realización específica, la concentración CE50 está modulada en menos de un factor de aproximadamente 5 a aproximadamente 0,1, en comparación con la ABM no sustituida. En otra forma de realización específica, la concentración CE50 está modulada en menos de un factor de alrededor de 5 a alrededor de 2, en comparación con la ABM no sustituida. En otra forma de realización específica, la concentración CE50 está modulada en menos de un factor de aproximadamente 3 a aproximadamente 1, en comparación con la ABM no sustituida. En otra forma de realización específica, la concentración CE50 está modulada en menos de un factor de aproximadamente 2, en comparación con la ABM no sustituida. En otra forma de realización específica, la concentración CE50 está modulada en menos de un factor de aproximadamente 1, en comparación con la ABM no sustituida. En otra forma de realización específica, la concentración CE50 está modulada en menos de un factor de aproximadamente 0,1, en comparación con la ABM no sustituida. En otra forma de realización específica, la concentración CE50 está modulada en menos de un factor de aproximadamente 0,001, en comparación con la ABM no sustituida. En algunas realizaciones, la modulación como se indica anteriormente comprende un aumento en la CE50. En otras realizaciones, la modulación comprende una disminución en la CE50.

En otro aspecto, la descripción está dirigida a una ABM que comprende un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en: Id. de Sec. N°: 128, Id. de Sec. N°:129, Id. de Sec. N°:130, Id. de Sec. N°:131, Id. de Sec. N°:132, Id. de Sec. N°:133, Id. de Sec. N°:134, Id. de Sec. N°:135, Id. de Sec. N°:136, Id. de Sec. N°:137, Id. de Sec. N°:138, Id. de Sec. N°:139, Id. de Sec. N°:140, Id. de Sec. N°:141, Id. de Sec. N°:142, Id. de Sec. N°:143, Id. de Sec. N°:144, Id. de Sec. N°:145, Id. de Sec. N°:146, e Id. de Sec. N°:147.

En otro aspecto, la descripción está dirigida a un polipéptido aislado que codifica una región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina que comprende CDR modificados de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal ICR62 de rata y una región marco de cadena pesada derivada de una o más secuencias génicas de región variable de línea germinal humana, en los que dichos CDR modificados de cadena pesada comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en la posición Kabat seleccionada de entre el grupo que consiste en 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 52, 52a, 53, 54, 55, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 100a, 101, 102, y cualquier combinación de las mismas, y en el que dicho polipéptido, como parte de una molécula de unión a antígeno, se une específicamente a EGFR humano. En una realización específica, las CDR modificadas de cadena pesada comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones Kabat 27, 28, 29, 31, 52, 53, 54, 58, y 102. En otra realización específica, las CDR modificadas de cadena pesada comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones Kabat 27, 28, 31, 53, 54, y 58. En otra realización específica, las CDR modificadas de cadena pesada comprenden sustituciones de aminoácidos en todas las posiciones Kabat y Chothia dentro de las CDR de la cadena pesada excepto en las SDR. En otra realización específica, las CDR modificadas de cadena pesada comprenden sustituciones de aminoácidos en todas las posiciones dentro de las CDR de cadena pesada de Kabat y Chothia excepto en las posiciones Kabat 29, 52, 56, y 100b. La descripción también está dirigida a polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos aislados.

En otro aspecto, la descripción está dirigida a un polipéptido aislado que codifica una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende la CDR modificada de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal ICR62 de rata y una región marco de cadena ligera derivada de una o más secuencias génicas de región variable de línea germinal humana, en el que dicha CDR modificada de cadena ligera comprende una o más sustituciones de aminoácidos en la posición Kabat seleccionada de entre el grupo que consiste en 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, y cualquier combinación de las mismas, y en el que dicho polipéptido, como parte de una molécula de unión a antígeno, se une específicamente a EGFR humano. En una realización específica, la CDR modificada de cadena ligera comprende sustituciones de aminoácidos en todas las posiciones dentro de la CDR de cadena ligera de Kabat y Chothia, excepto en las SDR. En otra realización específica, la CDR modificada de cadena ligera comprende sustituciones de aminoácidos en todas las posiciones dentro de la CDR de cadena ligera de Kabat y Chothia excepto en las posiciones Kabat 34 y 50. La descripción también está dirigida a polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos aislados. La descripción también está dirigida a una ABM que comprende los polipéptidos aislados.

En otro aspecto, la descripción está dirigida a un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en: Id. de Sec. N°: 128, Id. de Sec. N°:129, Id. de Sec. N°:130, Id. de Sec. N°: 131, Id. de Sec. N°:132, Id. de Sec. N°:133, Id. de Sec. N°:134, Id. de Sec. N°:135, Id. de Sec.

Nº:136, Id. de Sec. Nº:137, Id. de Sec. Nº:138, Id. de Sec. Nº:139, Id. de Sec. Nº:140, Id. de Sec. Nº:141, Id. de Sec. Nº:142, Id. de Sec. Nº:143, Id. de Sec. Nº:144, Id. de Sec. Nº:145, Id. de Sec. Nº:146, e Id. de Sec. Nº:147, en el que dicho polipéptido, como parte de una molécula de unión a antígeno, se une específicamente a EGFR humano. En otro aspecto, la descripción está dirigida a una célula huésped transfectada con el polinucleótido, o un vector que comprende el polinucleótido. En una realización, el vector es un vector de clonación replicativo. En otra realización, el vector es un vector de expresión.

En otro aspecto, la descripción está dirigida a un método para producir una molécula de unión a antígeno que es capaz de competir con el anticuerpo monoclonal ICR62 de rata por la unión a EGFR humano, el método comprende cultivar una célula huésped de la descripción en un medio bajo condiciones que permiten la expresión de uno o más polinucleótidos que codifican una molécula de unión a antígeno, y recuperar la molécula de unión a antígeno.

En otro aspecto, las ABM de la descripción se han glicosmodificado para tener una estructura de oligosacárido alterada en la región Fc. En una realización particular, la región Fc posee un número reducido de residuos de fucosa en comparación con la correspondiente ABM no glicosmodificada.

En otro aspecto la descripción está dirigida a composiciones que comprenden una ABM de la descripción y un transportador farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la descripción está dirigida a un método de localizar células que expresan EGFR en un sujeto que comprende la administración al sujeto de una composición de la presente invención. En una realización particular, las células sobreexpresan EGFR. En otra realización particular, el método se realiza para tratar un trastorno tratable mediante el bloqueo de la señalización celular mediada por EGFR en dicho sujeto. En otra realización, la descripción está dirigida a ABM de la invención para utilizar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno tratable mediante el bloqueo de la señalización celular mediada por EGFR. En una realización, el trastorno es un trastorno de proliferación celular. En una realización particular, el trastorno de proliferación celular es cáncer. En una realización más particular, el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de vejiga, cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de riñón, y cáncer de cerebro.

En otro aspecto, la descripción está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende: (a) una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en: Id. de Sec. Nº:54, Id. de Sec. Nº:56, Id. de Sec. Nº:58, Id. de Sec. Nº:60, Id. de Sec. Nº:62, Id. de Sec. Nº:64, Id. de Sec. Nº:66, Id. de Sec. Nº:68, Id. de Sec. Nº:70, Id. de Sec. Nº:72, Id. de Sec. Nº:74, Id. de Sec. Nº: 122, e Id. de Sec. Nº:124; (b) una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en: Id. de Sec. Nº:76, Id. de Sec. Nº:78, Id. de Sec. Nº:80, Id. de Sec. Nº:82, Id. de Sec. Nº:84, Id. de Sec. Nº:86, Id. de Sec. Nº:88, Id. de Sec. Nº:90, Id. de Sec. Nº:92, Id. de Sec. Nº:94, Id. de Sec. Nº: 96, Id. de Sec. Nº:98, Id. de Sec. Nº:100, Id. de Sec. Nº:102, Id. de Sec. Nº:104, Id. de Sec. Nº:106, e Id. de Sec. Nº:126; y (c) Id. de Sec. Nº:108. En otro aspecto, la descripción está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende (a) una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. Nº:112 e Id. de Sec. Nº:114; (b) una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. Nº:116 e Id. de Sec. Nº:118; y (c) Id. de Sec. Nº:119. En una realización, cualquiera de estos polinucleótidos codifica un polipéptido de fusión. En otro aspecto, la presente invención excluye cualquiera o todos estos polinucleótidos aislados.

[0030] En otro aspecto, la descripción está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. Nº:2; Id. de Sec. Nº:4; Id. de Sec. Nº:6; Id. de Sec. Nº:8; Id. de Sec. Nº:10; Id. de Sec. Nº:12; Id. de Sec. Nº:14; Id. de Sec. Nº:16; Id. de Sec. Nº:18; Id. de Sec. Nº:20; Id. de Sec. Nº:22; Id. de Sec. Nº:24; Id. de Sec. Nº:26; Id. de Sec. Nº:28; Id. de Sec. Nº:30; Id. de Sec. Nº:32; Id. de Sec. Nº:34; Id. de Sec. Nº:36; Id. de Sec. Nº:38; Id. de Sec. Nº:40 e Id. de Sec. Nº: 120. En otro aspecto, la descripción está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. Nº:44; Id. de Sec. Nº:46; Id. de Sec. Nº:50; e Id. de Sec. Nº:52. En una realización, dichos polinucleótidos codifican polipéptidos de fusión. En otro aspecto, la descripción excluye cualquiera o todos estos polinucleótidos aislados.

La descripción está además dirigida a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos una identidad del 80%, 85%, 90%, 95%, o 99% con una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. Nº:2; Id. de Sec. Nº:4; Id. de Sec. Nº:6; Id. de Sec. Nº:8; Id. de Sec. Nº:10; Id. de Sec. Nº:12; Id. de Sec. Nº:14; Id. de Sec. Nº:16; Id. de Sec. Nº:18; Id. de Sec. Nº:20; Id. de Sec. Nº:22; Id. de Sec. Nº:24; Id. de Sec. Nº:26; Id. de Sec. Nº:28; Id. de Sec. Nº:30; Id. de Sec. Nº:32; Id. de Sec. Nº:34; Id. de Sec. Nº:36; Id. de Sec. Nº:38; Id. de Sec. Nº:40 e Id. de Sec. Nº:120, en el que dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión. En un aspecto adicional, la descripción está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que tiene al menos una identidad del 80% con una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. Nº:44; Id. de Sec. Nº:46; Id. de Sec. Nº:50; e Id. de Sec. Nº:52, en el que dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión. En otro aspecto, la descripción excluye cualquiera o todos de estos polinucleótidos aislados. En otro aspecto, la descripción excluye cualquiera o todos de estos polinucleótidos aislados.

La descripción también está dirigida a un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido quimérico que posee la secuencia de Id. de Sec. Nº:1. En una realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica un

polipéptido que posee la secuencia de Id. de Sec. N°:1; y una secuencia que codifica un polipéptido que posee la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie diferente de rata. La descripción también está dirigida a un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido quimérico que posee una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°:3; Id. de Sec. N°:5; Id. de Sec. N°:7; Id. de Sec. N°:9; Id. de Sec. N°:11; Id. de Sec. N°:13; Id. de Sec. N°:15; Id. de Sec. N°:17; Id. de Sec. N°:19; Id. de Sec. N°:21; Id. de Sec. N°:23; Id. de Sec. N°:25; Id. de Sec. N°:27; Id. de Sec. N°:29; Id. de Sec. N°:31; Id. de Sec. N°:33; Id. de Sec. N°:35; Id. de Sec. N°:37; Id. de Sec. N°:39; e Id. de Sec. N°:121. En una realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica un polipéptido que posee una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°:3; Id. de Sec. N°:5; Id. de Sec. N°:7; Id. de Sec. N°:9; Id. de Sec. N°:11; Id. de Sec. N°:13; Id. de Sec. N°:15; Id. de Sec. N°:17; Id. de Sec. N°:19; Id. de Sec. N°:21; Id. de Sec. N°:23; Id. de Sec. N°:25; Id. de Sec. N°:27; Id. de Sec. N°:29; Id. de Sec. N°:31; Id. de Sec. N°:33; Id. de Sec. N°:35; Id. de Sec. N°:37; Id. de Sec. N°:39; e Id. de Sec. N°:121; y una secuencia que codifica un polipéptido que posee la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie diferente de rata. En otro aspecto, la descripción excluye cualquiera o todos estos polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos.

En aún otro aspecto, la descripción está dirigida a un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido quimérico que posee la secuencia de Id. de Sec. N°:43. En una realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica un polipéptido que posee la secuencia de Id. de Sec. N°:43; y una secuencia que codifica un polipéptido que posee la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie diferente de rata. En aún otro aspecto, la descripción está dirigida a un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido quimérico que posee una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°:45; Id. de Sec. N°:49; e Id. de Sec. N°:51. En una realización, el polinucleótido comprende una secuencia que codifica un polipéptido que posee una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°:45; Id. de Sec. N°:49; e Id. de Sec. N°:51, y una secuencia que codifica un polipéptido que posee la secuencia de una región constante de cadena ligera de anticuerpo (CL), o un fragmento de la misma, de una especie diferente de rata. En otro aspecto, la descripción excluye cualquiera o todos estos polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos.

La descripción también está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que posee la región VH del anticuerpo ICR62, o variantes funcionales de las mismas, y una secuencia que codifica un polipéptido que posee la secuencia de una región Fc de anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie diferente de rata. En otro aspecto, la descripción está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que posee la región VL del anticuerpo ICR62, o variantes funcionales del mismo, y una secuencia que codifica un polipéptido que posee la secuencia de una región CL de un anticuerpo, o un fragmento de la misma, de una especie diferente de rata.

La descripción está dirigida también a un vector de expresión que comprende cualquiera de los polinucleótidos aislados descritos anteriormente, y a una célula huésped que comprende dicho vector de expresión. En otro aspecto, la descripción está dirigida a una célula huésped que comprende cualquiera de los polinucleótidos aislados descritos anteriormente.

En un aspecto, la descripción está dirigida a un polipéptido aislado que comprende: (a) una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en: Id. de Sec. N°:53 Id. de Sec. N°:55, Id. de Sec. N°:57, Id. de Sec. N°:59, Id. de Sec. N°:61, Id. de Sec. N°:63, Id. de Sec. N°:65, Id. de Sec. N°:67, Id. de Sec. N°:69, Id. de Sec. N°:71, Id. de Sec. N°:73, Id. de Sec. N°:123, e Id. de Sec. N°:125; (b) una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en: Id. de Sec. N°:75, Id. de Sec. N°:77, Id. de Sec. N°:79, Id. de Sec. N°:81, Id. de Sec. N°:83, Id. de Sec. N°:85, Id. de Sec. N°:87, Id. de Sec. N°:89, Id. de Sec. N°:91, Id. de Sec. N°:93, Id. de Sec. N°:95, Id. de Sec. N°:97, Id. de Sec. N°:99, Id. de Sec. N°:101, Id. de Sec. N°:103, Id. de Sec. N°:105, e Id. de Sec. N°:127; y (c) Id. de Sec. N°:107. en el que dicho polipéptido es un polipéptido de fusión. En otro aspecto, la descripción excluye cualquiera o todos de estos polipéptidos aislados. En otro aspecto, la descripción está dirigida a un polipéptido aislado que comprende (a) una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°:111 e Id. de Sec. N°:113; (b) Id. de Sec. N°:115, y (c) Id. de Sec. N°:117, en el que dicho polipéptido es un polipéptido de fusión. En otro aspecto, la descripción excluye cualquiera o todos de estos polipéptidos aislados.

La descripción también está dirigida a un polipéptido quimérico que comprende la secuencia de Id. de Sec. N°:1 o una variante de la misma. La descripción está dirigida también a un polipéptido quimérico que comprende la secuencia de Id. de Sec. N°:43 o una variante de la misma. En una realización, cualquiera de estos polipéptidos comprende además una región Fc humana y/o una región CL humana. La descripción también está dirigida a un polipéptido quimérico que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°:3; Id. de Sec. N°:5; Id. de Sec. N°:7; Id. de Sec. N°:9; Id. de Sec. N°:11; Id. de Sec. N°:13; Id. de Sec. N°:15; Id. de Sec. N°:17; Id. de Sec. N°:19; Id. de Sec. N°:21; Id. de Sec. N°:23; Id. de Sec. N°:25; Id. de Sec. N°:27; Id. de Sec. N°:29; Id. de Sec. N°:31; Id. de Sec. N°:33; Id. de Sec. N°:35; Id. de Sec. N°:37; Id. de Sec. N°:39; e Id. de Sec. N°:121, o una variante de la misma. La descripción está dirigida también a un polipéptido quimérico que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°:45; Id. de Sec. N°:49; e Id. de Sec. N°:51, o una variante de la misma. En una realización, cualquiera de estos polipéptidos comprende además una región Fc humana y/o una región CL humana. En una realización, la región Fc humana comprende IgG1.

En otro aspecto la descripción está dirigida a un polipéptido que comprende una secuencia derivada del anticuerpo ICR62 y una secuencia derivada de un polipéptido heterólogo y a una molécula de unión a antígeno que comprende dicho polipéptido. En una realización la molécula de unión a antígeno es un anticuerpo. En una realización preferida, el anticuerpo es quimérico. En otra realización preferida, el anticuerpo está humanizado o primatizado.

En otro aspecto, la descripción está dirigida a una ABM, que es capaz de competir con el anticuerpo de rata ICR62 para unirse por EGFR y que es quimérico. En una realización, la ABM es un anticuerpo o un fragmento de la misma. En otra realización, la ABM es un anticuerpo recombinante que comprende una región VH que posee una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 1; Id. de Sec. N°:3; Id. de Sec. N°:5; Id. de Sec. N°:7; Id. de Sec. N°:9; Id. de Sec. N°:11; Id. de Sec. N°:13; Id. de Sec. N°:15; Id. de Sec. N°:17; Id. de Sec. N°:19; Id. de Sec. N°:21; Id. de Sec. N°:23; Id. de Sec. N°:25; Id. de Sec. N°:27; Id. de Sec. N°:29; Id. de Sec. N°:31; Id. de Sec. N°:33; Id. de Sec. N°:35; Id. de Sec. N°: 37; Id. de Sec. N°:39; e Id. de Sec. N°:121. En otra realización, la ABM es un anticuerpo recombinante que comprende una región VL que posee una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°:43; Id. de Sec. N°:45; Id. de Sec. N°:49; e Id. de Sec. N°:51. En otra realización la ABM es un anticuerpo recombinante que está primatizado. En aún otra realización, la ABM es un anticuerpo recombinante que está humanizado. En otra realización, la ABM es un anticuerpo recombinante que comprenden una región Fc humana. En otra realización, cualquiera de las ABM discutidas anteriormente puede conjugarse con una porción como una toxina o un radioligando.

La descripción está relacionada además con una ABM como se ha descrito en este documento, dicha ABM posee oligosacáridos modificados. En una realización los oligosacáridos modificados poseen fucosilación reducida en comparación con los oligosacáridos no modificados. En otras realizaciones, los oligosacáridos modificados son híbridos o forman complejos. En otra realización, la ABM posee una proporción aumentada de oligosacáridos no fucosilados o bisectados, oligosacáridos no fucosilados en la región Fc de dicha molécula. En una realización, los oligosacáridos no fucosilados bisectados, son híbridos. En otra realización, los oligosacáridos no fucosilados bisectados, forman complejos. En una realización, al menos el 20% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido están bisectados no fucosilados o no fucosilados. En realizaciones más preferibles, al menos el 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% o 75% o más de los oligosacáridos están bisectados no fucosilados o no fucosilados.

La descripción está relacionada además con un polinucleótido que codifica cualquiera de las ABM descritas anteriormente, y con vectores de expresión y células que comprenden dicho polinucleótido.

La descripción está relacionada además con un método para producir una ABM, que es capaz de competir con el anticuerpo de rata ICR62 para unirse por EGFR y en el que dicha ABM es quimérico; dicho método comprende: (a) cultivar una célula huésped que comprende un polinucleótido que codifica una ABM descrita en este documento en un medio bajo condiciones que permiten la expresión de dicho polinucleótido que codifica dicha ABM; y (b) recuperar dicha ABM del cultivo resultante.

En otro aspecto, la descripción está relacionada con una composición farmacéutica que comprende la ABM descrita en este documento. Se contempla que la composición farmacéutica puede comprender además un transportador farmacéuticamente aceptable, un adyuvante o una combinación de los mismos.

En otro aspecto, la descripción está relacionada con el tratamiento de una enfermedad que se caracteriza por la expresión de EGFR (por ejemplo, expresión anormal o sobreexpresión de EGFR). El tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de la ABM descrita en este documento a un sujeto, preferiblemente un sujeto mamífero, y más preferiblemente un humano que lo necesite. En una realización preferida, la enfermedad debe tratarse mediante la administración de una ABM que es un anticuerpo quimérico (por ejemplo humanizado), o un fragmento quimérico de un anticuerpo. En una realización, la ABM debe administrarse en una cantidad de alrededor de 1,0 mg/kg a alrededor de 15,0 mg/kg. En otra realización, la ABM debe administrarse en una cantidad de alrededor de 15 mg/kg a alrededor de 12,0 mg/kg. En otra realización, la ABM debe administrarse en una cantidad de alrededor de 1,5 mg/kg a alrededor de 4,5 mg/kg. En otra realización, la ABM debe administrarse en una cantidad de alrededor de 4,5 mg/kg a alrededor de 12,0 mg/kg. En otra realización, la ABM debe administrarse en una cantidad seleccionada de entre el grupo que consiste en alrededor de 1,5, alrededor de 4,5, y alrededor de 12,0 mg/kg.

En aún otro aspecto, la descripción está relacionada con una célula huésped modificada para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que posee actividad GnTIII en una cantidad suficiente para modificar los oligosacáridos en la región Fc de la ABM producida por la célula huésped, en el que la ABM es capaz de competir con el anticuerpo de rata ICR62 para unirse por EGFR y en el que la ABM es quimérica. En una realización, el polipéptido que posee actividad GnTIII es un polipéptido de fusión. En otra realización, la ABM producida por la célula huésped es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está humanizado. En otra realización, la ABM comprende una región equivalente a la región Fc de una IgG humana.

La descripción también está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende al menos una (por ejemplo, una,

dos, tres, cuatro, cinco o seis) regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo de rata ICR62, o una variante o forma truncada del mismo que contiene al menos los residuos determinantes de la complementariedad para dicha región determinante de la complementariedad, en el que dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión. Preferiblemente, dichos polinucleótidos aislados codifican un polipéptido de fusión que es una molécula de unión a antígeno. En una realización, el polinucleótido comprende tres regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo de rata ICR62, o variantes o formas truncadas de los mismos que contienen al menos los residuos determinantes de la complementariedad para cada una de dichas tres regiones determinantes de la complementariedad. En otra realización, el polinucleótido codifica toda la región variable de la cadena pesada o ligera de un anticuerpo quimérico (por ejemplo, humanizado). La descripción está dirigida también a los polipéptidos codificados por dichos polinucleótidos.

En otra realización, la descripción está dirigida a una molécula de unión a antígeno que comprende al menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo de rata ICR62, o una variante o forma truncada del mismo que contiene al menos los residuos determinantes de la complementariedad para dicha región determinante de la complementariedad, y que comprende una secuencia derivada de un polipéptido heterólogo. En una realización, la molécula de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo de rata ICR62, o variantes o formas truncadas del mismo que contiene al menos los residuos determinantes de la complementariedad para cada una de estas tres regiones determinantes de la complementariedad. En otro aspecto, la molécula de unión a antígeno comprende la región variable de la cadena ligera o pesada de un anticuerpo. En una realización particularmente útil, la molécula de unión a antígeno es un anticuerpo quimérico, por ejemplo, humanizado. La descripción también está dirigida a métodos para realizar dichas moléculas de unión a antígeno, y el uso de las mismas en el tratamiento de enfermedades, que incluyen malignancias como el cáncer de vejiga, cerebro, cabeza y cuello, páncreas, pulmón, mama, ovario, colon, próstata, piel y riñón.

La célula huésped como se ha descrito en este documento pueden seleccionarse de entre el grupo que incluye, pero no se limita a, una célula HEK293-EBNA, una célula CHO, una célula BHK, una célula NSO, una célula SP2/0, una célula de mieloma YO, una célula de mieloma de ratón P3X63, una célula PER, una célula PER.C6 o una célula de hibridoma. En una realización, la célula huésped como se ha descrito en este documento comprende además un polinucleótido transfectado que comprende un polinucleótido que codifica la región VL del anticuerpo de rata ICR62 o variantes del mismo y una secuencia que codifica una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina humana. En otra realización, la célula huésped como se ha descrito en este documento comprende además un polinucleótido transfectado que comprende un polinucleótido que codifica la región VH del anticuerpo de rata ICR62 o variantes del mismo y una secuencia que codifica una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina humana.

En otro aspecto, la descripción está dirigida a una célula huésped que produce una ABM que presenta un aumento de la afinidad de unión al receptor Fc y/o un aumento de la función efectora como resultado de la modificación de sus oligosacáridos. En una realización, el aumento de la afinidad de unión es para un receptor Fc, en particular, el receptor FcγRIIIA. La función efectora contemplada en este documento puede seleccionarse de entre el grupo que incluye, pero no se limita a, aumento de la citotoxicidad celular mediada por Fc; aumento de la unión a células NK; aumento de la unión a macrófagos; aumento de la unión a células polimorfonucleadas; aumento de la unión a monocitos; aumento de apoptosis inducida por señalización directa; aumento de la maduración de las células dendríticas; y aumento de la privación de células T.

En otra realización, la célula huésped como se ha descrito en este documento comprende al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que posee actividad GnTIII que está operativamente unido elemento de promotor constitutivo.

En otro aspecto, la descripción está dirigida a un método para producir una ABM en una célula huésped, que comprende: (a) cultivar una célula huésped modificada para expresar al menos un polinucleótido que codifica un polipéptido de fusión que posee actividad GnTIII bajo condiciones que permiten la producción de dicha ABM y que permiten la modificación de los oligosacáridos presentes en la región Fc de dicha ABM; y (b) aislar dicha ABM; en el que dicha ABM es capaz de competir con el anticuerpo de rata ICR62 para unirse por EGFR y en el que dicha ABM es quimérica (por ejemplo, humanizada). En una realización, el polipéptido que posee actividad GnTIII es un polipéptido de fusión, preferiblemente que comprende el dominio catalítico de GnTIII y el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente Golgi heterólogo seleccionado de entre el grupo que consiste en el dominio de localización de manosidasa II, el dominio de localización de $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I ("GnTI"), el dominio de localización de manosidasa I, el dominio de localización de $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II ("GnTII"), y el dominio de localización de fucosiltransferasa $\alpha 1-6$ central. Preferiblemente, el dominio de localización Golgi es de la manosidasa II o GnTI.

En otro aspecto, la descripción está dirigida a un método para modificar el perfil de glicosilación de una ABM anti-EGFR producida mediante una célula huésped que comprende introducir en la célula huésped al menos un ácido nucleico o vector de expresión de la invención. En una realización, la ABM es un anticuerpo o un fragmento del mismo; preferiblemente que comprende la región Fc de un IgG. Alternativamente, el polipéptido es una proteína de

fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una IgG humana.

En un aspecto, la descripción está relacionada con un anticuerpo quimérico, recombinante, o un fragmento del mismo, capaz de competir con el anticuerpo de rata ICR62 para unirse por EGFR y tener una fucosilación reducida.

- 5 En otro aspecto, la descripción está dirigida a un método para modificar la glicosilación del anticuerpo recombinante o un fragmento de la misma de la invención mediante el uso de un polipéptido de fusión que posee actividad GnTIII y que comprende el dominio de localización Golgi de un polipéptido heterólogo residente en Golgi. En una realización, los polipéptidos de fusión de la invención comprenden el dominio catalítico de GnTIII. En otra realización, el dominio
- 10 de localización Golgi se selecciona del grupo que consiste en: el dominio de localización de manosidasa II, el dominio de localización de GnTI, el dominio de localización de manosidasa I, el dominio de localización de GnTII y el dominio de localización de fucosiltransferasa α 1-6 central. Preferiblemente, el dominio de localización Golgi es de manosidasa II o GnTI.
- 15 En una realización, el método como se ha descrito en este documento está dirigido para producir un anticuerpo quimérico recombinante, o un fragmento del mismo, con oligosacáridos modificados en los que dichos oligosacáridos modificados poseen fucosilación reducida en comparación con oligosacáridos no modificados. De acuerdo con la presente invención, estos oligosacáridos modificados pueden ser híbridos o forman complejos. En otra realización, el método como se ha descrito en este documento está dirigido para producir un anticuerpo quimérico recombinante, (por ejemplo, humanizado) o un fragmento del mismo que posee una proporción
- 20 aumentada de oligosacáridos no fucosilados bisectados, en la región Fc de dicho polipéptido. En una realización, los oligosacáridos no fucosilados bisectados son híbridos. En otra realización, los oligosacáridos no fucosilados bisectados forman complejos. En otra realización, el método como se ha descrito en este documento está dirigido para producir un anticuerpo quimérico recombinante, o un fragmento del mismo que posee al menos un 20% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido bisectados, no fucosilados. En una realización preferida, al menos el 30% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido están bisectados, no fucosilados. En otra realización preferida, en la que al menos el 35% de los oligosacáridos en la región Fc de dicho polipéptido están bisectados, no fucosilados.
- 25 En otro aspecto, la descripción está dirigida a un anticuerpo quimérico recombinante, o un fragmento del mismo, que presenta un aumento de la afinidad de unión al receptor Fc y/o un aumento de la función efectora como resultado de la modificación de sus oligosacáridos. En una realización, el aumento de la afinidad de unión se debe a un receptor activador de Fc. En otra realización, el receptor Fc es un receptor activador de Fc γ , en particular, el receptor Fc γ R11A. La función efectora contemplada en este documento puede seleccionarse de entre el grupo que incluye, pero no se limita a, aumento de la citotoxicidad celular mediada por Fc; aumento de la unión a células NK; aumento de la unión a macrófagos; aumento de la unión a células polimorfonucleares; aumento de la unión a monocitos; aumento de la apoptosis inducida por señalización directa; aumento de la maduración de células dendríticas; y aumento de la primación de células T.
- 30 En otro aspecto, la descripción está dirigida a un fragmento de anticuerpo quimérico recombinante, (por ejemplo, humanizado), que posee la especificidad de unión del anticuerpo de rata ICR62 y que contiene la región Fc, que está modificada para tener un aumento de la función efectora producida por cualquiera de los métodos de la presente invención.
- 35 En otro aspecto, la descripción está dirigida a una proteína de fusión que incluye un polipéptido que posee una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 1; Id. de Sec. N°:3; Id. de Sec. N°:5; Id. de Sec. N°:7; SEQ m No:9; SEQ m No:11; Id. de Sec. N°:13; Id. de Sec. N°:15; Id. de Sec. N°:17; Id. de Sec. N°:19; Id. de Sec. N°:21; Id. de Sec. N°:23; Id. de Sec. N°:25; Id. de Sec. N°:27; Id. de Sec. N°:29; Id. de Sec. N°:31; Id. de Sec. N°:33; Id. de Sec. N°:35; Id. de Sec. N°:37; Id. de Sec. N°:39; e Id. de Sec. N°:121, y una región equivalente con la
- 40 región Fc de una inmunoglobulina y modificada para tener un aumento de la función efectora producida por cualquiera de los métodos descritos en este documento. En otro aspecto, la descripción excluye cualquiera o todos de estos polipéptidos aislados.
- 45 En otro aspecto, la descripción está dirigida a una proteína de fusión que incluye un polipéptido que posee una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°:43; Id. de Sec. N°:45; Id. de Sec. N°:49; e Id. de Sec. N°:51 y una región equivalente con la región Fc de una inmunoglobulina y modificada para tener un aumento de la función efectora producida por cualquiera de los métodos descritos en este documento. En otro aspecto, la descripción excluye cualquiera o todos de estos polipéptidos aislados.
- 50 En un aspecto, la descripción está dirigida a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo recombinante, quimérico (por ejemplo, humanizado), producido por cualquiera de los métodos descritos en este documento, y un transportador farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la descripción está dirigida a una composición farmacéutica que comprende un fragmento recombinante, quimérico (por ejemplo, humanizado) de un anticuerpo producido por cualquiera de los métodos descritos en este documento, y un transportador farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la descripción está dirigida a una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión producida por cualquiera de los métodos descritos en este documento, y un
- 55
- 60
- 65

transportador farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la descripción está dirigida a una composición para utilizar en la localización de células in vivo o in vitro que expresan EGFR. En una realización, la descripción está dirigida a una composición que comprende una ABM descrita en este documento para utilizar en la localización de células que expresan EGFR en un sujeto.

En aún otro aspecto, la descripción está dirigida a un método para la detección in vivo o in vitro de la presencia de EGFR en una muestra, por ejemplo, para el diagnóstico de un trastorno relacionado con la expresión de EGFR. En una realización, la detección se realiza poniendo en contacto una muestra a analizar, opcionalmente con una muestra control, con una ABM como se ha descrito en este documento, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre la ABM y EGFR. La formación del complejo se detecta entonces (por ejemplo, mediante ELISA u otros métodos conocidos en la materia). Cuando se utiliza una muestra control con las muestras de prueba, cualquier diferencia estadísticamente significativa en la formación de complejos ABM-EGFR cuando se comparan las muestras prueba y control es indicativo de la presencia de EGFR en la muestra de prueba.

La descripción está dirigida también a un método para tratar un trastorno relacionado con la expresión de EGFR, en particular, un trastorno de proliferación celular en el que se expresa EGFR, y más en particular, en el que EGFR se expresa de forma anormal (por ejemplo sobreexpresa), que incluye cáncer de vejiga, cerebro, cabeza y cuello, páncreas, pulmón, mama, ovario, colon, próstata, piel y riñón que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo quimérico recombinante, (por ejemplo, humanizado) o fragmento del mismo, producido por cualquiera de los métodos como se ha descrito en este documento, a un sujeto humano que lo necesite.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la actividad funcional de cadenas ligeras y pesadas de polipéptido individuales de ICR62 quimérico rata-humano cuando se combina con las construcciones ICR62 humanizadas 1-HHC (cadena pesada) y I-KB (cadena ligera). rVL representa la cadena ligera quimérica, y rVH representa la cadena pesada quimérica. La designación "r" indica que los dominios variables son del anticuerpo de rata original.

La Figura 2 muestra la actividad de unión de anticuerpos ICR62 humanizados que comprenden construcciones de región variable de cadena pesada de I-HHC, I-HHA y I-HLA y construcciones de región variable de cadena ligera de I-KA y I-KB emparejadas en varias configuraciones.

La Figura 3 muestra la actividad de unión de anticuerpos ICR62 humanizados que comprenden construcciones de región variable de cadena pesada de I-HLB, I-HLC y I-HLA y construcciones de región variable de cadena ligera de I-KA y I-KC emparejadas en varias configuraciones.

La Figura 4 muestra la actividad de unión de anticuerpos ICR62 humanizados que comprenden construcciones de región variable de cadena pesada de I-HLA2, I-HLA3 y I-HLA4 y construcciones de región variable de cadena ligera de I-KC humanizados en comparación con anticuerpo quimérico ICR62 de rata-humano.

La Figura 5 muestra la actividad de unión de anticuerpos ICR62 humanizados que comprenden construcciones de región variable de cadena pesada de I-HLA1, I-HLA3, I-HLA5 y I-HLA6 y construcciones de región variable de cadena ligera de I-KC humanizados en comparación con anticuerpo quimérico ICR62 de rata-humano.

La Figura 6 muestra la actividad de unión de anticuerpos ICR62 humanizados que comprenden construcciones de región variable de cadena pesada de I-HLA7, I-HLA6, y I-HHB y construcciones de región variable de cadena ligera de I-KC humanizados en comparación con anticuerpo quimérico ICR62 de rata-humano.

La Figura 7 muestra la actividad de unión de anticuerpos ICR62 humanizados que comprenden construcciones de región variable de cadena pesada de I-HHF, I-HLA9, y I-HLA8 y construcciones de región variable de cadena ligera de I-KC humanizados en comparación con anticuerpo quimérico ICR62 de rata-humano.

La Figura 8 muestra la actividad de unión de anticuerpos humanizados que comprenden construcciones de región variable de cadena pesada de I-HHB, I-HHD, I-HHG, I-HHF, I-HLA7, y I-HLA9 y construcciones de región variable de cadena ligera de I-KC humanizados.

La Figura 9 muestra una comparación de la citotoxicidad celular mediada por anticuerpo (CCDA) para varias glicoformas del anticuerpo quimérico ICR62, así como para las variantes de I-HLA4 humanizadas. "G1" se refiere a la glicomodificación del anticuerpo mediante coexpresión con GnTIIL. "G2" se refiere a glicomodificación del anticuerpo mediante coexpresión con GnTIII y ManII. "WT" se refiere a anticuerpos que no han sido glicomodificados. Las construcciones de cadena pesada humanizadas se emparejaron con la construcción de cadena ligera de I-KC.

La Figura 10 muestra una comparación de CCDA para la forma no glicomodificada (WT) y la glicoforma G2 (es decir,

glicomodificado mediante la coexpresión con GnTIII y ManII) de las construcciones de anticuerpos ICR62 humanizados I-HHB y IHLA7. Los mismos anticuerpos se aplicaron a dos líneas celulares diana diferentes: en el Panel A, se utilizó la línea celular diana LN229; en el Panel B, se utilizó la línea celular diana A431. Las construcciones de cadena pesada humanizadas se emparejaron con la construcción de cadena ligera de I-KC.

La Figura 11A y 11B muestra una comparación de CCDA para formas no glicomodificadas (WT) y glicoformas G2 de ICR62 quimérico y las construcciones de anticuerpo ICR62 humanizadas I-HHB y I-HLA7. Se utilizó la línea celular diana A431. Las construcciones de cadena pesada humanizadas se emparejaron con la construcción de cadena ligera de I-KC.

La Figura 12 muestra una comparación de CCDA en 72h para las glicoformas G2 o ICR62 quimérico y las construcciones de anticuerpo ICR62 humanizadas I-HHB y I-HLA7. Las construcciones de cadena pesada humanizadas se emparejaron con la construcción de cadena ligera de I-KC.

La Figura 13 muestra un alineamiento de secuencias de aminoácido de construcciones de región variable de cadena pesada de ICR62 humanizados en comparación con las secuencias de ICR62 de rata. Los puntos representan identidad de residuos de aminoácido en una posición determinada en una construcción determinada.

La Figura 14 muestra un ensayo de unión FcγRIIIa-Fc utilizando células CHO que presentan FcγRIIIa recombinante humano. Un anticuerpo IgG1 I-HHB/KC glicomodificado humanizado anti-EGFR en comparación con un anticuerpo no glicomodificado (Wt).

La Figura 15 muestra un perfil de oligosacárido EM-MALDI/TOF para un anticuerpo IgG1 glicomodificado humanizado anti-EGFR, I-HHB/KC. La glicomodificación se logró mediante la sobreexpresión de genes en las células productoras de anticuerpo que codifican enzimas con GnTIII y actividades Golgi Manosidasa II, proporcionando alrededor de un 70% de oligosacáridos unidos Fc-Asn297 no fucosilados.

La Figura 16 muestra un perfil de precisión anti-EGFR (n=6 replicas a lo largo del rango de calibración) para la determinación de anti-EGFR en 1% de matriz de suero de mono (suero de mono CMS25/31/33, suministrado por HLS).

La Figura 17 muestra una curva de calibración representativa anti-EGFR para la determinación de anti-EGFR en 1% de matriz de suero de mono.

La Figura 18 muestra concentraciones de suero de anti-EGFR el día 1 de la administración intravenosa semanal de anti-EGFR en monos cynomolgus macho.

La Figura 19 muestra concentraciones de suero de anti-EGFR el día 1 de la administración intravenosa semanal de anti-EGFR en monos cynomolgus hembra.

La Figura 20 muestra la relación entre áreas bajo la curva de tiempos de concentración de suero anti-EGFR (AUC₁₆₈) y nivel de dosis el día 1 de la administración intravenosa semanal de anti-EGFR en monos cynomolgus.

La Figura 21 muestra concentraciones de suero de anti-EGFR durante la administración intravenosa semanal de anti-EGFR en monos cynomolgus macho.

La Figura 22 muestra concentraciones de suero de anti-EGFR durante la administración intravenosa semanal de anti-EGFR en monos cynomolgus hembra.

La Figura 23 muestra el perfil de oligosacáridos EM-MALDI/TOF a partir de anticuerpo anti-EGFR (glicomodificado) con Fc modificado utilizado en los estudios de mono in vivo descritos en los ejemplos que vienen a continuación.

La Figura 24 muestra la unión a EGFR expresada en la superficie de células de carcinoma epidermoide A431 humano. El anticuerpo utilizado para el estudio de unión fue el anticuerpo anti-EGFR Fc-modificado (construcción I-HHB) utilizado para los estudios de monos in vivo descritos en los ejemplos que vienen a continuación.

La Figura 25 muestra la unión a EGFR expresada en la superficie de células de riñón COS-7. El anticuerpo utilizado fue el anticuerpo anti-EGFR (cadena pesada I-HHB; cadena ligera I-KC). Para referencia, se muestra la unión a células que expresan poco EGFR humano, células de cáncer de mama MCF-7.

La Figura 26 muestra la unión Fc-FcγRIIIa utilizando una célula completa (células CHO modificadas para expresar FcγRIIIa humano en su superficie). El anticuerpo utilizado fue el anticuerpo anti-EGFR Fc-modificado (glicomodificado) utilizado para los estudios de monos in vivo descritos en los ejemplos que vienen a continuación. Para comparación, se muestra la unión a de un anticuerpo IgG1 control no Fc-modificado (no modificado).

La Figura 27 muestra CCDA mediada por anticuerpo anti-EGFR Fc-modificado (glicomodificado). Las células diana

son A549 humano células de carcinoma de pulmón. Para comparación, se muestra la actividad CCDA para la forma no Fc-modificada (no modificada) del anticuerpo.

La Figura 28 muestra CCDA mediada por anticuerpo anti-EGFR Fc-modificado (glicomodificado). Las células diana son de la línea celular de queratinocito de mono cynomolgus CYNOM-K1. Para comparación, se muestra la actividad CCDA para la forma no Fc-modificada (no modificada) del anticuerpo.

La Figura 29 muestra la unión a la diana de EGFR de varias variantes de construcción de cadena ligera basadas en la construcción I-KC emparejada con la construcción de cadena pesada de I-HHD.

La Figura 30 muestra la unión a la diana de EGFR de varias variantes de construcción de cadena ligera basadas en la construcción I-KC emparejada con la construcción de cadena pesada de I-HHD.

La Figura 31 muestra la unión a la diana de EGFR de varias variantes de construcción de cadena pesada basadas en la construcción I-HHD emparejada con la construcción de cadena ligera de I-KC.

La Figura 32 muestra la unión a la diana de EGFR de varias variantes de construcción de cadena pesada basadas en la construcción I-HHD emparejada con la construcción de cadena ligera de I-KC.

Descripción detallada de la invención

Los términos que se utilizan en este documento son en general los mismos que se utilizan en la materia, a no ser que se definan de otra manera como sigue a continuación.

Tal como se utiliza en este documento, el término anticuerpo pretende incluir las moléculas de anticuerpo completas, que incluyen anticuerpos monoclonales, policlonales y multispecíficos (por ejemplo, biespecíficos), así como fragmentos de anticuerpo que poseen la región Fc y retienen la especificidad de unión, y proteínas de fusión que incluyen una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina y que retienen la especificidad de unión. También están abarcados los fragmentos de anticuerpo que retienen la especificidad de unión que incluye, pero no se limita a, fragmentos VH, fragmentos VL, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos scFv, fragmentos Fv, minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, y tetracuerpos (véase, por ejemplo, Hudson y Souriau, Nature Med. 9: 129-134 (2003)). También están abarcados los anticuerpos humanizados, primatizados y quiméricos.

Tal como se utiliza en este documento, el término región Fc pretende referirse a una región C-terminal de una cadena pesada de IgG. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de IgG puede variar ligeramente, la región Fc de la cadena pesada de IgG humano está definido normalmente para abarcar desde el residuo de aminoácido en la posición Cys226 hasta el carboxilo terminal.

Tal como se utiliza en este documento, el término región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina pretende incluir variantes alélicas que aparecen de forma natural en la región Fc de una inmunoglobulina así como variantes que poseen alteraciones que producen sustituciones, adiciones, o deleciones pero que no disminuyen sustancialmente la capacidad de la inmunoglobulina de mediar funciones efectoras (como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo). Por ejemplo, uno o más aminoácidos pueden deleccionarse del extremo N terminal o extremo C terminal de la región Fc de una inmunoglobulina sin una pérdida sustancial de la función biológica. Dichas variantes pueden seleccionarse de acuerdo con las reglas generales conocidas en la materia para tener un mínimo efecto sobre la actividad. (Véase, por ejemplo, Bowie, J. U. et al., Science 247:1306-1310 (1990).

Tal como se utiliza en este documento, el término EGFR se refiere al receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (también conocido como HER-1 o Erb-B1) (Ulrich, A. et al., Nature 309:418-425 (1984); SwissProt N° de acceso P00533; números de acceso secundarios: 000688, 000732, P06268, Q14225, Q92795, Q9BZS2, Q9GZX1, Q9H2C9, Q9H3C9, Q9UMD7, Q9UMD8, Q9UMG5), así como las isoformas naturales y variantes de las mismas. Dichas isoformas y variantes incluyen pero no se limitan a la variante EGFRvIII, los productos alternativos de corte y empalme (por ejemplo, los identificados por el SwissProt con número de acceso P00533-1, P00533-2, P00533-3, P00533-4), variantes GLN-98, ARG-266, Lys-521, ILE-674, GLY-962, y PRO-988 (Livingston, R.J. et al., NIEHS-SNPs, environmental genome project, NIEHS ES15478, Department of Genome Sciences, Seattle, WA (2004)), y otros identificados mediante los siguientes números de acceso: NM_005228.3, NM_201282.1, NM_201283.1, NM_201284.1 (REFSEQ mRNAs); AF125253.1, AF277897.1, AF288738.1, AI217671.1, AK127917.1, AL598260.1, AU137334.1, AW163038.1, AW295229.1, BC0S7802.1, CB160831.1, K03193.1, U48722.1, U95089.1, X00588.1, X00663.1; H54484S1, H54484S3, H54484S2 (ensamblaje MIPS); DT.453606, DT.86855651, DT.95165593, DT.97822681, DT.95165600, DT.100752430, DT.91654361, DT.92034460, DT.92446349, DT.97784849, DT.101978019, DT.418647, DT.86842167, DT.91803457, DT.92446350, DT.95153003, DT.95254161, DT97816654, DT.87014330, DT.87079224 (ensamblaje DOTS).

Tal como se utiliza en este documento, el término ligando de EGFR se refiere a un polipéptido que se une a y/o activa EGFR. El término incluye formas del precursor unido a membrana del ligando de EGFR, así como formas solubles procesadas proteolíticamente del ligando de EGFR.

Tal como se utiliza en este documento, el término activación del ligando de EGFR se refiere a la transducción de señales (por ejemplo, las provocadas por un dominio quinasa intracelular de los residuos de tirosina que fosforilan el receptor de EGFR en el EGFR o un polipéptido sustrato) mediado por la unión del ligando de EGFR.

Tal como se utiliza en este documento, el término enfermedad o trastorno caracterizado por la activación anormal o producción de EGFR o un ligando de EGFR o trastorno relacionado con la expresión de EGFR, se refiere a una condición, que puede o no involucrar malignancia o cáncer, en el que la activación anormal y/o producción de EGFR y/o un ligando de EGFR ocurre en células o tejidos de un sujeto que tiene, o está predispuesto a la enfermedad o trastorno.

Tal como se utiliza en este documento, los términos sobreexpresar, sobreexpresado, y sobreexpresión, tal como se utiliza en conexión con las células que expresan EGFR, se refiere a células que tienen niveles mayores mesurables de EGFR en la superficie del mismo en comparación con una célula normal del mismo tipo de tejido. Dicha sobreexpresión puede estar provocada por amplificación génica o mediante aumento de la transcripción o traducción. La expresión de EGFR (y por lo tanto, la sobreexpresión) puede estar determinada en un ensayo diagnóstico o pronóstico mediante la evaluación de los niveles de EGFR presentes en la superficie de una célula o en un lisado celular mediante técnicas que son conocidas en la materia: por ejemplo, mediante un ensayo inmunohistoquímico, ensayo de inmunofluorescencia, ensayo inmunoenzimático, ELISA, citometría de flujo, radioinmunoensayo, Western blot, unión a ligando, actividad quinasa, etc. (véase en general, CELL BIOLOGY: A LABORATORY HANDBOOK, Celis, J., ed., Academic Press (2d ed., 1998); CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE, Coligan, J.E. et al., eds., John Wiley & Sons (1995-2003); véase también, Sumitomo et al., Clin. Cancer Res. 10: 794-801 (2004) (describe Western blot, citometría de flujo, e inmunohistoquímica)). Alternativamente, o adicionalmente, uno puede medir los niveles de moléculas de ácido nucleico en la célula que codifican EGFR, por ejemplo, mediante hibridación fluorescente in situ, Southern blotting, o técnicas de PCR. Los niveles de EGFR en células normales se comparan con los niveles de células afectadas mediante un trastorno de proliferación celular (por ejemplo, cáncer) para determinar si EGFR se sobreexpresa.

Tal como se utiliza en este documento, el término molécula de unión a antígeno se refiere en su sentido más amplio a una molécula que se une específicamente a un determinante antigénico. Una molécula de unión a antígeno puede ser, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento del mismo que se puede unir específicamente a un determinante antigénico. Más específicamente, una molécula de unión a antígeno que se une a EGFR es una molécula que se une específicamente a un receptor transmembrana de 170 kDa, denominado normalmente como receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), pero también conocido como HER-1 o ErbB1. Por "se une específicamente" se entiende que la unión es selectiva para el antígeno y puede discriminarse de interacciones no deseadas o no específicas.

Tal como se utiliza en este documento, los términos fusión y quimérico, cuando se utilizan en referencia a polipéptidos como las ABM se refieren a polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos derivadas de dos o más polipéptidos heterólogos, como porciones de anticuerpos de diferentes especies. Para las ABM quiméricas, por ejemplo, los componentes que no se unen a antígenos pueden derivar de una amplia variedad de especies, que incluyen primates como los chimpancés y humanos. La región constante de la ABM quimérica es más preferiblemente casi idéntica a la región constante de un anticuerpo natural humano, la región variable del anticuerpo quimérico es más preferiblemente casi idéntico a la de un anticuerpo recombinante anti-EGFR que posee una secuencia de aminoácidos de una región variable murina. Los anticuerpos humanizados son una forma particularmente preferida de anticuerpo de fusión o quimérico.

Tal como se utiliza en este documento, un polipéptido que posee actividad GnTIII se refiere a polipéptidos que son capaces de catalizar la adición de un residuo de N-acetilglucosamina (GlcNAc) en una unión β -1-4 al manósido β -unido de un núcleo trimanosil de oligosacáridos N unidos. Esto incluye polipéptidos de fusión que presentan actividad enzimática similar a, pero no necesariamente idéntica a, una actividad de β (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III, también conocida como β -1,4-manosil-glicoproteína 4-beta- -acetilglucosaminiltransferasa (EC 2.4.1.144), de acuerdo con el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB), tal como se mide en un ensayo biológico particular, con o sin dependencia de dosis. En el caso en el que exista la dependencia de dosis, necesita ser idéntica a la de GnTIII, pero en lugar de sustancialmente similar a la dependencia de dosis en una actividad determinada en comparación con el GnTIII (es decir, el polipéptido candidato presentará mayor actividad o no más de alrededor de 25 veces menos y preferiblemente, no más de alrededor de diez veces menos actividad, y más preferiblemente, no más de alrededor de tres veces menos actividad en relación a GnTIII.)

Tal como se utiliza en este documento, el término variante (o análogo) se refiere a un polipéptido que difiere a un polipéptido específicamente recitado de la invención mediante inserción, delección, y sustituciones de aminoácidos, creado mediante el uso de por ejemplo, técnicas de DNA recombinante. Variantes de ABM como se ha descrito en este documento incluye moléculas de unión a antígeno quiméricas, primatizadas o humanizadas en las que uno o varios de los residuos de aminoácido están modificados mediante sustitución, adición y/o delección de forma que no afecta sustancialmente a la afinidad de unión del antígeno (por ejemplo, EGFR). Las guías para determinar qué

residuos de aminoácido pueden sustituirse, añadirse o delecionarse sin eliminar las actividades de interés, puede encontrarse mediante la comparación de la secuencia del polipéptido particular con la de los péptidos homólogos y minimizar el número de cambios en la secuencia de aminoácido realizados en las regiones de gran homología (regiones conservadas) o mediante la sustitución de aminoácidos con la secuencia consenso.

Alternativamente, las variantes recombinantes que codifican estos mismos o polipéptidos similares pueden sintetizarse o seleccionarse mediante el uso de la "redundancia" del código genético. Varias sustituciones de codones, como los cambios silenciosos que producen varios sitios de restricción, pueden introducirse para optimizar el clonaje en un plásmido o vector viral o de expresión en un sistema procariota o eucariota particular. Las mutaciones en la secuencia de polinucleótido puede reflejarse en el polipéptido o dominios de otros péptidos añadidos al polipéptido para modificar las propiedades de cualquier parte del polipéptido, para cambiar las características como las afinidades de unión a ligando, afinidades intercadena, o tasa de intercambio degradación.

Las "sustituciones" de aminoácidos pueden ser, por ejemplo, el resultado de sustituir un aminoácido con otro aminoácido que posee propiedades estructurales y/o químicas similares, es decir, sustituciones de aminoácido conservativas. Las sustituciones de aminoácidos "conservativas" pueden realizarse en base de la similitud en la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, y/o la naturaleza antipática de los residuos involucrados. Por ejemplo, aminoácidos no polares (hidrofóbicos) incluye alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano, y metionina; los aminoácidos neutrales polares incluye glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, y glutamina; aminoácidos positivamente cargados (básicos) incluye arginina, lisina, e histidina; y aminoácidos negativamente cargados (ácidos) incluye ácido aspártico y ácido glutámico. Las "Inserciones" o "delecciones" están preferiblemente en el rango de alrededor de 1 a 20 aminoácidos, más preferiblemente 1 a 10 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse experimentalmente mediante la realización sistemática de inserciones, delecciones, o sustituciones de aminoácidos en una molécula de polipéptido utilizando técnicas de DNA recombinante y analizando la actividad de las variantes recombinantes resultantes.

Tal como se utiliza en este documento, el término humanizado se utiliza para referirse a una molécula de unión a antígeno derivada de una molécula de unión a antígeno no humana, por ejemplo, un anticuerpo murino, que retiene o sustancialmente retiene las propiedades de unión a antígeno de la molécula parental pero que es menos inmunogénico en humanos. Esto puede lograrse mediante varios métodos que incluyen (a) injertar la totalidad de dominios variables no humanos en las regiones constantes humanas para generar anticuerpos quiméricos, (b) injertar solo las CDR humanas en el esqueleto humano y las regiones constantes con o sin retención de residuos estructurales críticos (por ejemplo, aquellos que son importantes para retener buena afinidad de unión a antígeno o funciones de anticuerpo), o (c) transplantar la totalidad de dominios variables no humanos, pero "camuflándolos" con una sección similar a la humana mediante la sustitución de residuos en la superficie. Dichos métodos se describen en Jones et al., Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 81:6851-6855 (1984); Morrison y Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Verhoeven et al.; Science, 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun., 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun., 31(3):169-217 (1994). Existen generalmente 3 regiones determinantes de la complementariedad, o CDR, (CDR1, CDR2 y CDR3) en cada uno de los dominios variables de la cadena ligera y pesada de un anticuerpo, que están flanqueados por cuatro subregiones marco (es decir, FR1, FR2, FR3, y FR4) en cada uno de los dominios variables de la cadena ligera y pesada de un anticuerpo: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Una discusión de los anticuerpos humanizados puede encontrarse, entre otros, en la Patente EE.UU. N° 6.632.927, y en la solicitud EE.UU. publicada N° 2003/0175269. En otros ejemplos, solo los residuos de los CDR que son necesarios para la unión pueden transferirse (por ejemplo, "injertarse") en una secuencia humana para crear una secuencia completa de región variable con especificidad de antígeno.

De forma similar, tal como se utiliza en este documento, el término primatizado se utiliza para referirse a una molécula de unión a antígeno derivada de una molécula de unión a antígeno no primate, por ejemplo, un anticuerpo murino, que retiene o sustancialmente retiene las propiedades de unión a antígeno de la molécula parental pero que es menos inmunogénico en primates.

En el caso que existan dos o más definiciones de un término que se utiliza y/o acepta en la técnica, la definición del término tal como se utiliza en este documento pretende incluir todos estos significados a no ser que se especifique lo contrario de forma explícita. Un ejemplo específico es el uso del término "región determinante de la complementariedad" ("CDR") para describir los sitios de antígeno combinados no contiguos encontrados en la región variable de ambos polipéptidos de cadena ligera y pesada. Esta región particular ha sido descrita por Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) y por Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), en la que las definiciones incluyen el solapamiento o subgrupos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre otros. Sin embargo, la aplicación de cualquier definición para referirse a una CDR de un anticuerpo o variantes de las mismas pretende estar dentro del alcance del término como se ha definido y utilizado en este documento. Los residuos de aminoácido apropiados que abarcan las CDR como se ha definido por cada una de las referencias citadas anteriormente se describen más adelante en la Tabla I como comparación. Los números de residuo exactos que abarcan una CDR particular variará dependiendo de la secuencia y tamaño de la CDR. Los expertos en la materia pueden determinar de forma rutinaria qué residuos comprende una CDR particular dada la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo.

TABLA 1. Definiciones de CDR ¹

	Kabat	Chothia	AbM ²
V _H CDR1	31-35	26-32	26-35
V _H CDR2	50-65	52-58	50-58
V _H CDR3	95-102	95-102	95-102
V _L CDR1	24-34	26-32	24-34
V _L CDR2	50-56	50-52	50-56
V _L CDR3	89-97	91-96	89-97
1 La numeración de todas la definiciones de CDR en la Tabla 1 está de acuerdo con la numeración acordada descrita por Kabat et al. (véase más adelante).			
2 "AbM" se refiere a la CDR como se ha definido por el programa de modelaje de anticuerpos Oxford Molecular's "AbM".			

- 5 Kabat et al. también definieron un sistema de numeración para secuencias de dominio variable que es aplicable a cualquier anticuerpo. Un experto en la materia puede asignar sin ambigüedades este sistema de "numeración Kabat" a cualquier secuencia de dominio variable, sin depender de ningún dato experimental más allá de la propia secuencia. Tal como se utiliza en este documento, "la numeración Kabat" se refiere al sistema de numeración descrito por Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). A no ser que se especifique de otra manera, las referencias a la numeración de posiciones específicas de residuos de aminoácido en una ABM son de acuerdo con el sistema de numeración Kabat. Las secuencias del listado de secuencias (es decir, Id. de Sec. N°:1 a Id. de Sec. N°:147) no están numeradas de acuerdo con el sistema de numeración Kabat. No obstante, tal como se ha dicho anteriormente, un experto en la materia podrá determinar el esquema de numeración Kabat de cualquier secuencia de la región variable en el listado de secuencias en base a la numeración de las secuencias tal como se presenta aquí.

Mediante un ácido nucleico o polinucleótido que posee una secuencia de nucleótido al menos, por ejemplo, un 95% "idéntico" a una secuencia de nucleótidos de referencia como se ha descrito en este documento, pretende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido sea idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia de polinucleótidos puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que posee una secuencia de nucleótidos de al menos un 95% idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta un 5% de nucleótidos en la secuencia de referencia puede delecionarse o sustituirse con otro nucleótido, o un número de nucleótidos hasta un 5% de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia puede insertarse en la secuencia de referencia.

De forma práctica, si cualquier molécula o polipéptido de ácido nucleico particular es al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de nucleótidos o secuencia de polipéptidos de la presente invención puede determinarse de forma convencional utilizando programas de computador conocidos. Un método preferible para determinar el mejor emparejamiento entre una secuencia de búsqueda (una secuencia descrita en este documento) y una secuencia sujeto, también referida como alineamiento global de secuencia, puede determinarse utilizando el programa de computador FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag et al., Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990). En un alineamiento de secuencias las secuencias de búsqueda y sujeto son ambas secuencias de DNA. Una secuencia de RNA puede compararse mediante la conversión de U a T. El resultado de dicho alineamiento global de secuencia es en porcentaje de identidad. Los parámetros preferidos utilizados en un alineamiento FASTDB de secuencias de DNA para calcular el porcentaje de identidad son: Matriz=Unitaria, k-tupla=4, Penalización por desemparejamiento=1, Penalización por unión=30, longitud del grupo de aleatorización=0, puntuación de corte=1, Penalización por hueco=5, Penalización por tamaño de hueco 0,05, tamaño de ventana=500 o la longitud de la secuencia de nucleótidos sujeto, lo que sea más corto.

Si la secuencia sujeto es más corta que la secuencia de búsqueda debido a delecciones 5' o 3', no debido a delecciones internas, una corrección manual debe realizarse para los resultados. Esto es debido a que el programa FASTDB no tiene en cuenta las truncaciones 5' y 3' de la secuencia sujeto cuando se calcula el porcentaje de identidad. Para las secuencias sujeto truncadas en los extremos 5' o 3', en relación a la secuencias búsqueda, el porcentaje de identidad se corrige calculando el número de bases de la secuencia de búsqueda que son 5' y 3' de la secuencia sujeto, que no están emparejadas/alineadas, como porcentaje de las bases totales de las secuencias de búsqueda. Se determina si un nucleótido está emparejado/alineado mediante los resultados de la secuencia de alineamiento FASTDB. Este porcentaje se sustrae entonces del porcentaje de identidad, calculado mediante el programa FASTDB anterior utilizando los parámetros especificados, para llegar a un porcentaje final de puntuación de identidad. Esta puntuación corregida es lo que se utiliza con el propósito de la presente invención. Solo las bases fuera de las bases 5' y 3' de la secuencia sujeto, tal como se muestra para el alineamiento FASTDB, que no está emparejado/alineado con las secuencias de búsqueda, están calculadas con el propósito de ajustar manualmente el porcentaje de puntuación de identidad.

Por ejemplo, una secuencia sujeto de 90 bases está alineada a una secuencia de búsqueda de 100 bases para

determinar el porcentaje de identidad. Las deleciones aparecen en el extremo 5' de la secuencia sujeto y por lo tanto, el alineamiento FASTDB no muestra un emparejamiento/alineamiento de las primeras 10 bases en el extremo 5'. Las 10 bases desemparejadas representan el 10% de la secuencia (número de bases en los extremos 5' y 3' no emparejadas/ número total de bases en las secuencias de búsqueda) por lo que el 10% se sustrae de la puntuación del porcentaje de identidad calculado mediante el programa FASTDB. Si las 90 bases restantes se emparejan perfectamente, el porcentaje de identidad final será del 90%. En otro ejemplo, una secuencia sujeto de 90 bases se compara con una secuencia de búsqueda de 100 bases. Esta vez las deleciones son deleciones internas por lo que no hay bases en el 5' o 3' de la secuencia sujeto que no estén emparejados/alineados con la de búsqueda. En este caso el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no está corregido manualmente. De nuevo, solamente las bases 5' y 3' de la secuencia sujeto que no están emparejadas/alineadas con la secuencia de búsqueda están manualmente corregidas. No hace falta realizar más correcciones manuales con el propósito de la presente invención.

Por un polipéptido que posee una secuencia de aminoácidos "idéntica" en al menos, por ejemplo, un 95% a una secuencia de búsqueda de aminoácidos descrita en este documento, pretende que la secuencia de aminoácido del polipéptido sujeto sea idéntica a la secuencia de búsqueda excepto que la secuencia de polipéptido sujeto puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácido por cada 100 aminoácidos de la secuencia de búsqueda de aminoácidos. En otras palabras, para obtener un polipéptido que posee una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 95% con una secuencia de búsqueda de aminoácidos, hasta un 5% de los residuos de aminoácido en la secuencia sujeto puede insertarse, deleccionarse, o sustituirse con otro aminoácido. Estas alteraciones de la secuencia de referencia puede ocurrir en las posiciones amino o carboxi terminal de la secuencia de aminoácido de referencia o en cualquier lugar entre estas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los residuos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

De forma práctica, si cualquier polipéptido particular es idéntico en al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a un polipéptido de referencia puede determinarse convencionalmente utilizando programas de computador conocidos. Un método preferible para determinar el mejor emparejamiento general entre una secuencia de búsqueda (una secuencia descrita en este documento) y una secuencia sujeto, también referida como un alineamiento de secuencia global, puede determinarse utilizando el programa de computadora FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag et al., Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990). En un alineamiento de secuencia las secuencias sujeto y de búsqueda son ambas secuencias de nucleótidos o ambas secuencias de aminoácidos. El resultado de dicho alineamiento global de secuencias es en porcentaje de identidad. Los parámetros preferibles utilizados en el alineamiento de aminoácidos FASTDB son: Matriz =PAM 0, , k-tupla = 2, Penalización por desemparejamiento =1, Penalización por unión =20, longitud del grupo de aleatorización =0, puntuación de corte =1, tamaño de ventana = longitud de la secuencia, Penalización por hueco =5, Penalización por tamaño de hueco =0,05, tamaño de ventana =500 o la longitud de la secuencia de nucleótidos sujeto, lo que sea más corto.

Si la secuencia sujeto es más corta que la secuencia de búsqueda debido a deleciones en N- o C-terminal, no debido a deleciones internas, debe realizarse una corrección manual a los resultados. Esto es debido a que el programa FASTDB no cuenta las truncaciones de la secuencia sujeto en N- y C-terminal cuando se calcula el porcentaje de identidad global. Para las secuencias sujeto truncadas en el extremo N- y C-terminal, en relación a las secuencias de búsqueda, el porcentaje de identidad se corrige calculando el número de residuos de la secuencia de búsqueda que están en N- y C-terminal de la secuencia sujeto, que no están emparejada/ alineada con el correspondiente residuo sujeto, como porcentaje de las bases totales de las secuencias de búsqueda. Se determina si un residuo está emparejado/alineado mediante el resultado del alineamiento de secuencia FASTDB. Este porcentaje se sustrae del porcentaje de identidad, calculado mediante el programa FASTDB anterior utilizando los parámetros especificados, para llegar a la puntuación de porcentaje de identidad final. Esta puntuación de porcentaje de identidad final es lo que se utiliza para los propósitos de la presente invención. Solamente los residuos de los extremos N- y C-terminal de la secuencia sujeto, que no están emparejados/alineados con las secuencias de búsqueda, se consideran para el propósito del ajuste manual de la puntuación del porcentaje de identidad. Esto es, solamente las posiciones del residuo de búsqueda fuera de los residuos N- y C-terminal más lejanos de la secuencia sujeto.

Por ejemplo, una secuencia sujeto de 90 residuos de aminoácidos está alineada a una secuencia de búsqueda de 100 residuos para determinar el porcentaje de identidad. Las deleciones aparecen en el extremo N terminal de la secuencia sujeto y por lo tanto, el alineamiento FASTDB no muestra un emparejamiento/alineamiento de los primeros 10 residuos del extremo N terminal. Los 10 residuos desemparejados representan el 10% de la secuencia (número de residuos en los extremos N- y C- terminal no emparejados/ número total de residuos en las secuencias de búsqueda) por lo que el 10% se sustrae de la puntuación del porcentaje de identidad calculado mediante el programa FASTDB. Si los 90 residuos restantes se emparejan perfectamente, el porcentaje de identidad final será del 90%. En otro ejemplo, una secuencia sujeto de 90 residuos se compara con una secuencia de búsqueda de 100 residuos. Esta vez las deleciones son deleciones internas por lo que no hay residuos en los extremos N- o C-terminal de la secuencia sujeto que no están emparejadas/alineadas con la de búsqueda. En este caso el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no está corregido manualmente. De nuevo, solamente las posiciones de residuo fuera de los extremos N- y C-terminal de la secuencia sujeto, tal como se muestra en el alineamiento FASTDB, que no están emparejadas/ alineadas con la secuencia de búsqueda están manualmente corregidas. No hace falta

realizar más correcciones manuales con el propósito de la presente invención.

Tal como se utiliza en este documento, un ácido nucleico "que hibrida bajo condiciones astringentes" con una secuencia de ácido nucleico de la invención, se refiere a un polinucleótido que hibrida en una incubación durante la noche a 42°C en una solución que comprende formamida al 50%, 5x SSC (NaCl 750 mM, citrato sódico 75 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), solución Denhardt's 5x, sulfato de dextrano al 10%, y 20 mg/ml DNA de esperma de salmón desnaturalizado, seguido por el lavado de filtros en SSC 0,1x a alrededor de 65°C.

Tal como se utiliza en este documento, el término dominio de localización Golgi se refiere a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido residente en Golgi que es responsable de anclar el polipéptido en la localización dentro del complejo de Golgi. En general, los dominios de localización comprenden las "colas" amino terminal de una enzima.

Tal como se utiliza en este documento, el término función efectora se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una secuencia nativa de la región Fc o variante de la secuencia de aminoácidos de la región Fc) de un anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluye, pero no se limitan a, afinidad de unión al receptor Fc, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA), fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (FCDA), secreción de citoquinas, captación de antígeno mediada por inmunocomplejos mediante células presentadoras de antígeno, desregulación de receptores de superficie celular, etc.

Tal como se utiliza en este documento, los términos modificar, modificado, modificación y glicomodificación se consideran que incluyen cualquier manipulación del patrón de glicosilación de un polipéptido natural o recombinante o fragmento del mismo. La glicomodificación incluye modificación metabólica de la maquinaria de glicosilación de una célula, que incluye manipulaciones genéticas de las rutas de síntesis de oligosacáridos para lograr la glicosilación alterada de glicoproteínas expresadas en células. Además, la glicomodificación incluye los efectos de mutaciones y ambiente celular en la glicosilación. En una realización, la glicomodificación es una alteración en la actividad glicosiltransferasa. En una realización particular, la modificación resulta en la alteración de la actividad glucosaminiltransferasa y/o actividad fucosiltransferasa.

Tal como se utiliza en este documento, el término célula huésped cubre cualquier tipo de sistema celular que puede modificarse para generar los polipéptidos y moléculas de unión a antígenos descritas en este documento. En una realización, la célula huésped está modificada para permitir la producción de una molécula de unión a antígeno con glicoformas modificadas. En una realización preferida, la molécula de unión a antígeno es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, o proteína de fusión. En ciertas realizaciones, las células huésped han sido posteriormente manipuladas para expresar niveles aumentados de uno o más polipéptidos que poseen actividad GnTIII. Las células huésped incluyen células cultivadas, por ejemplo, células de mamífero cultivadas, como células CHO, células HEK293-EBNA, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células hibridoma, células de levadura, células de insecto, y células vegetales, para nombrar solo unas cuantas, pero también células comprendidas dentro de un animal transgénico, planta transgénico o planta cultivada o tejido animal.

Tal como se utiliza en este documento, el término citotoxicidad celular mediada por Fc incluye citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo y citotoxicidad celular mediada por una proteína de fusión Fc soluble que contiene una región Fc humana. Es un mecanismo inmune que conduce a la lisis de "células marcadas con anticuerpo" mediante "células inmunoefectoras humanas", en las que:

Las células inmuno efectoras humana, son una población de leucocitos que presentan receptores Fc en su superficie a través de las que se unen a la región Fc de anticuerpos o de proteínas de fusión Fc y realizar las funciones efectoras. Dicha población puede incluir, pero no se limita a, células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y/o células asesinas naturales (NK).

Las células marcadas con anticuerpo son células unidas por los anticuerpos o proteínas de fusión Fc. Los anticuerpos o proteínas de fusión Fc se unen a células diana mediante la parte de proteína N-terminal a la región Fc.

Tal como se utiliza en este documento, el término citotoxicidad celular mediada por Fc aumentada se define como un aumento en el número de "células marcadas con anticuerpo" que están lisadas en un tiempo determinado, a una concentración de anticuerpo determinada, o de una proteína de fusión Fc, en el medio que rodea las células diana, mediante el mecanismo de la citotoxicidad celular mediada por Fc, definido anteriormente, y/o una reducción en la concentración de anticuerpo, o de proteína de fusión Fc, en el medio circundante a las células diana, necesario para alcanzar la lisis de un número determinado de "células marcadas con anticuerpo", en un tiempo determinado, mediante el mecanismo de la citotoxicidad celular mediada por Fc. El aumento en la citotoxicidad celular mediada por Fc, está relacionada con la citotoxicidad celular mediada por el mismo anticuerpo, o proteína de fusión Fc, producida por el mismo tipo de células huésped, utilizando la misma producción estándar, métodos de purificación, formulación y almacenaje, que son conocidos por los expertos en la materia, pero que no se han producido por células huésped modificados para expresar la glicosiltransferasa GnTIII mediante los métodos descritos en este documento.

Por anticuerpo que posee aumentada la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) se entiende un anticuerpo, como el término definido en este documento, que posee aumentada la CCDA tal como se ha determinado por cualquier método adecuado conocido por los expertos en la materia. Un ejemplo de un ensayo CCDA aceptado in vitro es el que sigue:

- 1) el ensayo utiliza células diana que son conocidas por expresar el antígeno diana reconocido por la región de unión a antígeno del anticuerpo;
- 2) el ensayo utiliza células mononucleares de sangre periférica humanas (CMSP), aisladas de la sangre de un donante sano escogido aleatoriamente, como células efectoras;
- 3) el ensayo se lleva a cabo de acuerdo con el siguiente protocolo:

- i) las CMSP se aíslan utilizando procedimientos de centrifugación por densidad estándar y están suspendidos a 5×10^6 células/ml en medio de cultivo celular RPMI;
- ii) las células diana se hacen crecer mediante métodos de cultivo celular estándar, se recogen en la fase de crecimiento exponencial con una viabilidad superior al 90%, se lavan en medio de cultivo celular RPMI, se marcan con 100 micro-Curies de ^{51}Cr , se lavan dos veces con medio de cultivo celular, y se resuspenden en medio de cultivo celular a una densidad de 10^5 células/ml;
- iii) 100 microlitros de la suspensión de células diana final anterior se transfieren a cada pocillo de una placa de 96 pocillos;
- iv) el anticuerpo se diluye de forma seriada desde 4000 ng/ml a 0,04 ng/ml en medio de cultivo celular y se añaden 50 microlitros de las soluciones de anticuerpo resultantes a las células diana en una placa de 96 pocillos, analizando por triplicado varias concentraciones de anticuerpo cubriendo el rango completo de concentración anterior;
- v) para los controles de máxima liberación (MR), 3 pocillos adicionales en la placa que contiene las células diana marcadas, recibieron 50 microlitros de una solución acuosa al 2% (V/V) de detergente no iónico (Nonidet, Sigma, St. Louis), en lugar de la solución de anticuerpo (punto iv anterior);
- vi) para los controles de liberación espontánea (SR), 3 pocillos adicionales en la placa que contiene las células diana marcadas, recibieron 50 microlitros de medio de cultivo celular RPMI en lugar de la solución de anticuerpo (punto iv anterior);
- vii) la placa de 96 pocillos se centrifuga entonces a $50 \times g$ durante 1 minuto y se incubó durante 1 hora a 4°C ;
- viii) se añadieron 50 microlitros de la suspensión de CMSP (punto i anterior) a cada pocillo para proporcionar una proporción de células efectoras:diana de 25:1 y las placas se colocaron en un incubador bajo una atmósfera de CO_2 al 5% a 37°C durante 4 horas;
- ix) el sobrenadante libre de células de cada pocillo se recogió y la radioactividad liberada experimentalmente (ER) se cuantificó utilizando un contador gamma;
- x) el porcentaje de lisis específica se calculó para cada concentración de anticuerpo de acuerdo con la fórmula $(\text{ER}-\text{MR}) / (\text{MR}-\text{SR}) \times 100$, en la que ER es la radioactividad media cuantificada (ver punto ix anterior) para esa concentración de anticuerpo, MR es la radioactividad media cuantificada (ver punto ix anterior) para los controles MR (ver punto v anterior), y SR es la radioactividad media cuantificada (ver punto ix anterior) para el control SR (ver punto vi anterior);
- 4) "CCDA aumentada" se define como un aumento en el porcentaje máximo de lisis específica observada dentro del rango de concentración de anticuerpo analizado anterior, y/o una reducción en la concentración de anticuerpo necesaria para alcanzar la mitad del porcentaje máximo de lisis específica observada dentro del rango de concentración de anticuerpo analizado anterior. El aumento en la CCDA es relativa a la CCDA, medida, por ejemplo, con el anterior ensayo, mediado por el mismo anticuerpo, producido por el mismo tipo de células huésped, utilizando la misma producción estándar, purificación, formulación y métodos de almacenamiento, que son conocidos por los expertos en la materia, pero que no se ha producido por células huésped modificadas para sobreexpresar GnTIII.

En un aspecto, la descripción está relacionada con moléculas de unión a antígeno que poseen la especificidad de unión del anticuerpo monoclonal ICR62 de rata (es decir, se une a sustancialmente el mismo epítipo), y para descubrir que sus funciones efectoras pueden aumentarse mediante la alteración de la glicosilación. En una realización, la molécula de unión a antígeno es un anticuerpo quimérico, En una realización preferida, la descripción está dirigida a un anticuerpo quimérico, o un fragmento del mismo, que comprende uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis) CDR de cualquiera de Id. de Sec. N°:53-108 y/o Id. de Sec. N°: 122-127. Específicamente, en una realización preferida, la descripción está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende (a) una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en: Id. de Sec. N°:54 Id. de Sec. N°:56, Id. de Sec. N°:58, Id. de Sec. N°:60, Id. de Sec. N°:62, Id. de Sec. N°:64, Id. de Sec. N°:66, Id. de Sec. N°:68, Id. de Sec. N°:70, Id. de Sec. N°:72, Id. de Sec. N°:74, Id. de Sec. N°:122, e Id. de Sec. N°:124; (b) una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en: Id. de Sec. N°:76, Id. de Sec. N°:78, Id. de Sec. N°:80, Id. de Sec. N°:82, Id. de Sec. N°:84, Id. de Sec. N°:86, Id. de Sec. N°:88, Id. de Sec. N°:90, Id. de Sec. N°:92, Id. de Sec. N°:94, Id. de Sec. N°:96, Id. de Sec. N°:98, Id. de Sec. N°:100, Id. de Sec. N°:102, Id. de Sec. N°:104, Id. de Sec. N°:106, e Id. de Sec. N°:126; y (c) Id. de Sec. N°:108. En otra realización preferida, la descripción está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende (a) una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°:112 e Id. de Sec. N°:114; (b) una

secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°:116 e Id. de Sec. N°:118; y (c) Id. de Sec. N°:119. En una realización, cualquiera de estos polinucleótidos codifica un polipéptido de fusión. En otros aspectos la descripción, puede excluir cualquiera o todas estas secuencias de polinucleótido.

En otra realización, la molécula de unión a antígeno comprende el dominio VH del anticuerpo de rata ICR62 codificado por Id. de Sec. N°:1 o Id. de Sec. N°:2, o una variante del mismo; y un polipéptido no murino. En otra realización preferida, la descripción está dirigida a una molécula de unión a antígeno que comprende el dominio VL del anticuerpo de rata codificado por Id. de Sec. N°:43 o Id. de Sec. N°:44, o una variante del mismo; y un polipéptido no murino. En otros aspectos la descripción puede excluir cualquiera o una de estas secuencias de polinucleótidos.

En otro aspecto, la descripción está dirigida a moléculas de unión a antígeno que comprenden uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis) CDR truncados o variantes de CDR de ICR62. Dichas CDR truncados o variantes de CDR contendrán, como mínimo, los residuos de aminoácido determinantes de la especificidad para dicho CDR. Por "residuo determinante de la especificidad" se entiende aquellos residuos que están directamente implicados en la interacción con el antígeno. En general, solamente alrededor de un quinto a un tercio de los residuos en un CDR determinado, participan en la unión a antígeno. Los residuos determinantes de la complementariedad en un CDR particular pueden identificarse mediante, por ejemplo, computación de contactos interatómicos a partir del modelaje tridimensional y determinación de la variabilidad de secuencia en una posición de residuo determinada de acuerdo con los métodos descritos en Padlan et al., FASEB J. 9(1):133-139 (1995). Por lo tanto, las moléculas de unión a antígeno (ABM) tal como se refieren en este documento también pretenden abarcar las ABM que comprende, por ejemplo, CDR truncados o variantes de CDR que comprende uno o más residuos determinantes de la especificidad, o que comprenden sustituciones en una o más posiciones dentro del CDR en comparación con un CDR de referencia (por ejemplo, los CDR de rata ICR62).

De acuerdo con esto, la descripción también está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende al menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo de rata ICR62, o una variante o forma truncada del mismo que contiene al menos los residuos determinantes de la complementariedad para dicha región determinante de la complementariedad, en el que dicho polinucleótido aislado codifica un polipéptido de fusión. Preferiblemente, dichos polinucleótidos aislados codifican un polipéptido de fusión que es una molécula de unión a antígeno. En una realización, el polinucleótido comprende tres regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo de rata ICR62, o variantes o formas truncadas de las mismas que contiene al menos los residuos determinantes de la complementariedad para cada una de dichas tres regiones determinantes de complementariedad. En una realización, el polinucleótido comprende al menos una de las CDR descritas en las Tablas 2-5, más adelante. En otra realización, el polinucleótido codifica la región variable completa de la cadena pesada o ligera de un anticuerpo quimérico (por ejemplo, humanizado). La descripción está dirigida también a los polipéptidos codificados por dichos polinucleótidos.

En otra realización, la descripción está dirigida a una molécula de unión a antígeno que comprende al menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco o seis) regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo de rata ICR62, o una variante o forma truncada del mismo que contiene al menos los residuos determinantes de la complementariedad (SDR) para dicha región determinante de la complementariedad, y que comprende una secuencia derivada de un polipéptido heterólogo. En una realización, la molécula de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo de rata ICR62, o variantes o formas truncadas del mismo que contiene al menos los residuos determinantes de la complementariedad para cada una de dichas tres regiones determinantes de la complementariedad. En una realización, la molécula de unión a antígeno comprende al menos una de las CDR descritas en las Tablas 2-5, más adelante. En otros aspectos, la presente invención puede excluir cualquiera o todas las secuencias CDR descritas en las Tablas 2-5, más adelante.

En una realización, la molécula de unión a antígeno comprende al menos uno de los SDR de los CDR del anticuerpo ICR62. En una realización, uno o más CDR de la ABM descritas en este documento comprende sustituciones en una o más posiciones de aminoácido, y la ABM retiene actividad de unión en comparación con la ABM sin sustituir. La actividad de unión puede medirse como se ha descrito en este documento y mediante los métodos que son rutina y bien conocidos en la materia. En algunas realizaciones, la concentración CE50 para la unión de la ABM sustituida está modulada por menos de un factor de alrededor 10 a alrededor de 0,001 en comparación con la ABM sin sustituir. En realizaciones particulares, la concentración CE50 está modulada por menos de un factor de 10 a alrededor de 1, alrededor de 10 a alrededor de 5, alrededor de 5 a alrededor de 0,1, alrededor de 5 a alrededor de 2, y alrededor de 3 a alrededor de 1 en comparación con la ABM sin sustituir. En realizaciones particulares, la concentración CE50 del anticuerpo sustituido está modulada por menos de un factor de alrededor de 10, alrededor de 9, alrededor de 8, alrededor de 7, alrededor de 6, alrededor de 5, alrededor de 4, alrededor de 3, alrededor de 2, alrededor de 1, alrededor de 0,05, alrededor de 0,25, alrededor de 0,1, alrededor de 0,005, alrededor de 0,025, y alrededor de 0,001 en comparación con la ABM sin sustituir. En una realización particular, la concentración CE50 está modulada por menos de un factor de alrededor de 10. En otras realizaciones, el factor CE50 está modulado por un factor de alrededor de 10, alrededor de 9, alrededor de 8, alrededor de 7, alrededor de 6, alrededor de 5, alrededor de 4, alrededor de 3, alrededor de 2, alrededor de 1, alrededor de 0,05, alrededor de 0,25, alrededor de 0,1, alrededor de 0,005, alrededor de 0,025, y alrededor de 0,001. En algunas realizaciones, la modulación es un descenso en el CE50. En otras realizaciones, la modulación es un aumento en el CE50.

El CDR de las ABM descritas en este documento pueden comprender sustituciones en cualquier residuo (de acuerdo con cualquiera de Chothia o Kabat o cualquier otra definición de CDR como se ha definido en este documento o conocido en la materia). En una realización, la CDR comprende sustituciones en cualquiera o todas las posiciones excepto para uno o más residuos determinantes de la especificidad. En una realización particular, la CDR comprende sustituciones en todas las posiciones excepto para los residuos determinantes de la especificidad. En una realización, la CDR de la cadena pesada de la presente invención comprende sustituciones en uno o más de las posiciones Kabat 27, 28, 29, 30, 31, 23, 33, 34, 35, 52, 52a, 53, 54, 55, 57, 58, 58, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 94, 96, 97, 98, 99, 100, 100a, 101, 102, o cualquier combinación de las mismas. En otra realización, la CDR comprende sustituciones en una o más de las posiciones Kabat 27, 28, o 29 de la CDR1 de la cadena pesada Chothia, posición 31 de la CDR1 de la cadena pesada Kabat, posiciones Kabat 52, 52a, 53, o 57 de la CDR2 de la cadena pesada Kabat, o la posición Kabat 102 de la CDR3 de la cadena ligera de Kabat.

En una realización la CDR de la cadena ligera comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más de las posiciones Kabat 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, o cualquier combinación de las mismas. En otra realización, la CDR comprende sustituciones en una o más de las posiciones Kabat 30 o 32 de la CDR1 de la cadena ligera de Kabat, posiciones Kabat 51, 52, 53, o 56 de la CDR2 de la cadena ligera de Kabat, o posición Kabat 94 de la CDR3 de la cadena ligera de Kabat. En otro aspecto, la ABM descrita en este documento comprende al menos un residuo determinante de la especificidad de al menos una región determinante de la complementariedad del anticuerpo de rata ICR62. En algunas realizaciones, la ABM comprende residuos determinantes de especificidad de las CRD de cadena pesada. En realizaciones más particulares, el residuo determinante de la especificidad de la cadena pesada se selecciona de entre el grupo que consiste en fenilalanina en la posición Kabat 29, asparagina en la posición Kabat 52, tirosina en la posición Kabat 56, y valina en la posición Kabat 100b. En una realización específica, los residuos determinantes de especificidad son tirosina en la posición Kabat 56 y valina en la posición Kabat 100b. En otra realización específica, los residuos determinantes de especificidad son fenilalanina en la posición Kabat 29, asparagina en la posición Kabat 52, tirosina en la posición Kabat 56 y valina en la posición Kabat 100b. En otras realizaciones, los residuos determinantes de especificidad están en la cadena ligera de la región determinante de la complementariedad. En realizaciones más particulares, el residuo determinante de la especificidad de la cadena ligera se selecciona de entre el grupo que consiste en asparagina en la posición Kabat 34, y asparagina en la posición Kabat 50. En una realización específica, el residuo determinante de la especificidad es asparagina en la posición Kabat 34. En otra realización específica, el residuo determinante de la especificidad es asparagina en la posición Kabat 50. En otra realización específica, los residuos determinantes de la especificidad son asparagina en la posición Kabat 34 y asparagina en la posición Kabat 50.

En otro aspecto, la molécula de unión a antígeno comprende la región variable de la cadena ligera o pesada de un anticuerpo. En una realización particularmente útil, la molécula de unión a antígeno es un anticuerpo quimérico, por ejemplo, humanizado. La descripción también está dirigida a métodos de realizar dichas moléculas de unión a antígeno, y el uso de las mismas en el tratamiento de enfermedades, particularmente trastornos de proliferación celular en el que se expresa EGFR, particularmente en el que EGFR está expresado anormalmente (por ejemplo, sobreexpresado) en comparación con tejido normal del mismo tipo celular. Dichos trastornos incluyen, pero no se limitan a cáncer de vejiga, cerebro, cabeza y cuello, páncreas, pulmón, mama, ovario, colon, próstata, piel, y riñón. Los niveles de expresión de EGFR pueden determinarse mediante métodos conocidos en la materia y aquellos descritos en este documento (por ejemplo, mediante ensayo inmunohistoquímico, ensayo de inmunofluorescencia, ensayo inmunoenzimático, ELISA, citometría de flujo, radioinmunoensayo, Western blot, ensayo de unión a ligando, actividad quinasa, etc.).

La descripción también está dirigida a una composición para utilizar en la localización in vivo o in vitro de células que expresan EGFR. Las células que expresan EGFR pueden localizarse con propósitos terapéuticos (por ejemplo, para tratar un trastorno que es tratable mediante la disrupción de la señalización mediada por EGFR por ejemplo mediante el bloqueo del ensayo de unión a ligando, o mediante la localización de células que expresan EGFR para la destrucción por el sistema inmunitario). En una realización, la descripción está dirigida a una composición que comprende una ABM descrita en este documento para utilizar en la localización de células que expresan EGFR en un sujeto. Las células que expresan EGFR pueden también localizarse con propósitos diagnósticos (por ejemplo, para determinar si expresan EGFR, de forma normal o anormal). Así, la descripción también está dirigida a métodos para la detección de la presencia de EGFR o una célula que expresa EGFR, ya sea in vivo o in vitro. Un método para detectar la expresión de EGFR de acuerdo con la descripción comprende poner en contacto una muestra a analizar opcionalmente con una muestra control, con una ABM de la presente invención, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre la ABM y EGFR. La formación del complejo se detecta entonces (por ejemplo, mediante ELISA u otros métodos conocidos en la materia). Cuando se utiliza una muestra control con la muestra de prueba, cualquier diferencia estadísticamente significativa en la formación de complejos ABM-EGFR cuando se comparan con las muestras de prueba y control es indicativo de la presencia de EGFR en la muestra prueba.

TABLA 2

CDR		Secuencia de nucleótido	Id. de Sec. N°
Cadena pesada CDR1	Kabat	GACTACAAGATACAC	54
		GACTACGCCATCAGC	56
		GACTACTATATGCAC	58
		GACTACAAGATATCC	122
	Chothia	GGTTTTACATTCACTCACTAC	60
		GGTTACACATTCACTGACTAC	62
		GGTTATTCACTCACTGACTAC	64
	AbM	GGTTTTACATTCACTGACTACAAGATACAC	66
		GGTTTTACATTCACTGACTACGCCATCAGC	68
		GGTTTTACATTCACTGACTACTATATGCAC	70
		GGTTACACATTCACTGACTACTATATGCAC	72
		GGTTATTCACTCACTGACTACAAGATACAC	74
		GGTTTCACATTCACTGACTACAACATATCC	124
Cadena pesada CDR2	Kabat	TATTTTAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTACAATGAAAAGTTCAAGAGC	76
		GGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGC	78
		TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATAGTACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGC	80
		TGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTACGCACAGAAGTTTCAGGGC	82
		TGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTACAGCCCAAGCTTCCAAGGC	84
		TGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTACAACGAGAAGTTCCAAGGC	86
		TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATTCGAACTGCGCACAGAAGTTCCAGGGC	88
		TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATGCCACGTACGCACAGAAGTTCCAGGGC	90
		TACTTCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACCTACAGCCCAAGCTTCCAAGGC	126
	Chothia	AATCCTAACAGTGGTTATAGTACC	92
		AACCCTAACAGCGGTTATTCGAAC	94
		AACCCTAACAGCGGTTATGCCACG	96
	AbM	TATTTTAATCCTAACAGTGGTTATAGTACC	98
		GGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACC	100
		TGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAGTACC	102
		TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATTCGAAC	104
		TATTTCAACCCTAACAGCGGTTATGCCACG	106
Cadena pesada CDR3	Kabat Chothia AbM	CTATCCCCAGGCGGTTACTATGTTATGGATGCC	108

5

TABLA 3

CDR		Secuencia de nucleótido	Id. de Sec. N°
Cadena pesada CDR1	Kabat	DYKIH	53
		DYAI	55
		DYYMH	57
		DYKIS	123
	Chothia	GFTFTDY	59
		GYTFTDY	61
		GYSFTDY	63
	AbM	GFTFTDYKIH	65
		GFTFTDYAI	67
		GFTFTDYMH	69
Cadena pesada CDR2	Kabat	YFNPNSGYSTYNEKFKS	75
		GINPNSGYSTYAOKTQG	77
		YFNPNSGYSTYAQKFQG	79
		WINPNSGYSTYAQKFQG	81
		WINPNSGYSTYSPSFQG	83
		WINPNSGYSTYNEKFQG	85
		YFNPNSGYSNYAQKFQG	87
		GFTFTDYMH	69
		GYTFTDYMH	71
		GYSFTDYKIH	73

	Chothia	YFNPNSGYATYAQKFQG	89
		YFNPNSGYSTYSPSFQG	127
		NPNSGYST	91
	AbM	NPNSGYSN	93
		NPNSGYAT	95
		YFNPNSGYST	97
		GINPNSGYST	99
		WINPNSGYST	101
		YFNPNSGYSN	103
Cadena pesada CDR3	Kabat Chothia AbM	YFNPNSGYAT	105
		LSPCGYYVMDA	107

TABLA 4

CDR	Secuencia de aminoácido	Id. de Sec. N°
Cadena ligera Kabat CDR1	KASQINNNYLN	111
	RASQGINNNYLN	113
Kabat Cadena ligera CDR2	NTNNLQT	115
Cadena ligera Kabat CDR3	LQHNSFPT	117

5

TABLA 5

CDR	Secuencia de nucleótidos	Id. de Sec. N°
Cadena ligera Kabat CDR1	AAAGCAAGTCAGAATATTAACAATTACTTAAAC	112
	CGGGCAAGTCAGGGCATTAAACAATTACTTAAAT	114
Cadena ligera Kabat CDR2	AATACAAACAATTTGCAAACA	116
	AATACCAACAACCTTGACAGACA	118
Cadena ligera Kabat CDR3	TTGCAGCATAATAGTTTCCACG	119

Se sabe que están involucrados varios mecanismos en la eficacia terapéutica de anticuerpos anti-EGFR, que incluye bloqueo de ligando (por ejemplo, EGF, TGF- α , etc.) la unión a EGFR y la posterior activación de las rutas de señalización, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA), y la inducción del arresto del crecimiento o diferenciación terminal.

10

El anticuerpo monoclonal de rata ICR62 (IgG2b) se discutió en la Publicación PCT N° WO 95/20045. Se dirigió contra el epítipo C de EGFR, y se mostró para inhibir el ensayo de unión a ligando, inhibir el crecimiento in vitro de carcinomas de células escamosas que expresan EGFR, e inducen la regresión de xenoinjertos de tumores en ratones atímicos (WO 95/20045; Modjtahedi et al., Br. J. Cancer 73:228-235 (1996)). Como anticuerpo total de roedor, la administración de anticuerpo monoclonal de rata ICR62 con humanos resulta en una respuesta HARA en algunos pacientes seguido incluso de una sola dosis. (WO 95/20045; Modjtahedi et al., Br. J. Cancer 73:228-235 (1996)).

15

20

Se han descrito anticuerpos de ratón/humano quiméricos. Véase, por ejemplo, Morrison, S. L. et al., PNAS 11: 6851-6854 (Noviembre 1984); Publicación de Patente Europea N° 173494; Boulianna, G. L. et al., Nature 312:642 (Diciembre 1984); Neubeiger, M. S. et al., Nature 314:268 (Marzo 1985); Publicación de Patente Europea N° 125023; Tan et al., J. Immunol. 135:8564 (Noviembre 1985); Sun, L. K et al., Hybridoma 5(1):517 (1986); Sahagan et al., J. Immunol. 137:1066-1074 (1986). Véase en general, Muron, Nature 312:597 (Diciembre 1984); Dickson, Genetic Engineering News 5(3) (Marzo 1985); Marx, Science 229:455 (August 1985); y Morrison, Science 229:1202-1207 (Septiembre 1985). IMC-C225 (Erbix®), Imclone es un anticuerpo quimérico monoclonal dirigido contra EGFR y que posee una región variable de ratón y una región constante humana (Véase Herbst y Shin, Cancer 94: 1593-1611 (2002)). La porción murina de IMC-C225 deriva de M225, que se ha encontrado que se une a EGFR e inhibe la fosforilación dependiente de quinasa inducida por EGF, así como inducir la apoptosis en las líneas de células tumorales que sobreexpresa EGFR (Herbst y Shin, Cancer 94: 1593-1611 (2002)). No obstante, M225 encontró una reacción HAMA en pacientes tratados con el anticuerpo en ensayos clínicos de fase I (Herbst y Shin, Cancer 94: 1593-1611 (2002)). IMC-225 se ha probado in vivo e in vitro, y se ha utilizado en combinación con radioterapia y quimioterapia en un número de tipos de tumor, que incluyen aquellos asociados con un pronóstico pobre (Herbst y Shin, Cancer 94: 1593-1611 (2002)). No obstante, IMC-225 se ha asociado con toxicidades como reacciones alérgicas y de piel en pacientes a los que se administra el anticuerpo IMC-225 en ensayos clínicos (Herbst y Shin, Cancer 94: 1593-1611 (2002)).

25

30

35

En una realización particularmente preferida, las ABM quiméricas descritas en este documento es un anticuerpo humanizado. Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos en la materia. Por ejemplo, ABM humanizadas como se ha descrito en este documento pueden prepararse de acuerdo con los métodos de Patente

40

Estadounidense N° 5.225.539 de Winter, Patente Estadounidense N° 6.180.370 de Queen et al., Patente Estadounidense N° 6.632.927 de Adair et al., o Solicitud de Patente Estadounidense N° 2003/0039649 de Foote. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado posee uno o más residuos de aminoácido introducidos en el mismo a partir de una fuente no humana. Estos residuos de aminoácido no humanos se refieren a menudo como residuos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988), sustituyendo "secuencias de región hipervariable por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. De acuerdo con esto, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente Estadounidense N° 4.816.567) en el que sustancialmente menos de un dominio variable intacto humano ha sido sustituido por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son anticuerpos normalmente humanos en los que algunos residuos de región hipervariable y posiblemente algunos residuos FR están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores. Los anticuerpos anti-EGFR humanizados comprenderán regiones constantes de inmunoglobulina humana.

La elección de dominios variables humanos, ambos ligeros y pesados, a utilizar en la fabricación de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el denominado método "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se analiza frente a toda la biblioteca de secuencias de dominio variable humano conocidas. La secuencia humana que está más cercana a la del roedor se acepta entonces como la región marco humana (FR) para el anticuerpo humanizado. (Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Otro método de selección de secuencia marco humana es comparar la secuencia de cada subregión individual del marco completo de roedor (es decir, FR1, FR2, FR3, y FR4) o alguna combinación de las subregiones individuales (por ejemplo, FR1 y FR2) frente a la biblioteca de secuencias variables de región humana conocida que corresponde con la subregión marco (por ejemplo, la determinada por la numeración Kabat), y escoger la secuencia humana de cada subregión o combinación que es la más cercana a la del roedor (Leung, Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense N° 2003/0040606A1, publicada el 27, Feb. 2003) Otro método utiliza una región marco particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas pesadas ligera o pesada. El mismo marco puede utilizarse para varios anticuerpos humanizados (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

También es importante que los anticuerpos estén humanizados con retención de alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr esta meta, de acuerdo con un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos conceptuales humanizados utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina pueden generarse utilizando programas de ordenador familiares para los expertos en la materia (por ejemplo, InsightII, Accelrys, Inc. (anteriormente MSI), o en <http://swissmodel.expasy.org>). Estos programas de ordenador pueden ilustrar y mostrar estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de candidatas seleccionadas de inmunoglobulina. La inspección de estas estructuras permite el análisis del rol más probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata a unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos FR pueden seleccionarse y combinarse del receptor e importar secuencias de forma que se consiga la característica del anticuerpo deseado, como el aumento de la afinidad para el antígeno diana. En general, los residuos de región hipervariable están directamente y más sustancialmente involucrados en influir la unión de antígeno.

En una realización, los anticuerpos descritos en este documento comprenden una región Fc humana. En una realización específica, la región constante humana es IgG1, tal como se explica en Id. de Sec. N° 109 y 110, y a continuación:

Secuencia de nucleótido IgG1 (Id. de Sec. N° 110)

ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGGC
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTG
TGGAATCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCT
CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC
AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA
GCAGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAA
CTCCTGGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGA
TCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG
AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTCTG
CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC
CCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACA
GGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGAC
CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG

5

GCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTT
CTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT
CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC
CCTGTCTCCGGGTAAATGA

Secuencia de aminoácidos IgG1 (Id. de Sec. N° 109)

10

TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

15

No obstante, también están abarcadas las variantes e isoformas de la región Fc humana en este documento mediante la presente invención. Por ejemplo, las variantes de regiones Fc adecuadas para utilizar en la descripción pueden producirse de acuerdo con los métodos descritos en la Patente Estadounidense N° 6.737.056 de Presta (variantes de región Fc con función efectora alterada debido a una o más modificaciones de aminoácido); o en la Sol. de Pat. Estadounidense N° 60/439.498; 60/456.041; 60/514.549; o WO 2004/063351 (variantes de regiones Fc con aumento de la afinidad de unión debido a la modificación de aminoácidos); o en la Sol. de Pat. Estadounidense N° 10/672.280 o WO 2004/099249 (variantes Fc con unión alterada a FcγR debido a la modificación de aminoácidos).

20

En otra realización, las moléculas de unión a antígeno descritas en este documento están diseñadas para tener afinidad de unión aumentada de acuerdo con, por ejemplo, los métodos descritos en la Sol. de Pub. de Pat. Estadounidense N° 2004/0132066 de Balint et al.

25

En una realización, la molécula de unión a antígeno descrita en este documento está conjugada con una porción adicional, como un radiomarcaje o una toxina. Dichas ABM conjugadas pueden producirse por numerosos métodos que son bien conocidos en la materia.

30

Una serie de radionúclidos son aplicables a la descripción y los expertos en la materia tienen la capacidad de determinar fácilmente qué radionúclido es el más apropiado bajo una serie de circunstancias. Por ejemplo, yodo¹³¹ es un radionúclido bien conocido utilizado para la inmunoterapia dirigida. No obstante, la utilidad clínica del yodo¹³¹ puede limitarse por varios factores que incluyen: vida media física de ocho días; deshalogenación del anticuerpo yodado en la sangre y en los lugares tumorales; y características de emisión (por ejemplo, gran componente gamma) que puede ser subóptimo para la deposición de dosis en el tumor. Con la llegada de agentes quelantes superiores, la oportunidad de unir grupos quelantes de metales a proteínas ha aumentado las oportunidades de utilizar otros radionúclidos como el indio¹¹¹ y el itrio⁹⁰. El itrio⁹⁰ proporciona muchos beneficios para la utilización en aplicaciones radioinmunoterapéuticas: la vida media a las 64 horas del itrio⁹⁰ es lo suficientemente larga para permitir la acumulación de anticuerpo por el tumor y, a diferencia de por ejemplo, el yodo¹³¹, el itrio⁹⁰ es un emisor

35

beta puro de alta energía sin radiación gamma acompañante en su decaimiento, con un rango en el tejido de 100 a 1000 células de diámetro. Además, la cantidad mínima de radiación penetrante permite la administración ambulatoria de anticuerpos marcados con itrio90. De forma adicional, la internalización de anticuerpo marcado no es necesaria para la muerte celular, y la emisión local de radiación ionizante podrá ser letal en las células tumorales adyacentes que carecen del antígeno diana.

Las dosis de tratamiento único efectivo (es decir, cantidades terapéuticamente efectivas) de anticuerpos anti-EGFR marcados con itrio90 están en el rango entre alrededor de 5 y alrededor de 75 mCi, más preferiblemente entre alrededor de 10 y alrededor de 40 mCi. Las dosis de tratamiento ablativo único efectivo que no sea de médula con anticuerpos anti-EGFR marcados con yodo131 están en el rango entre alrededor de 5 y alrededor de 70 mCi, más preferiblemente entre alrededor de 5 y alrededor de 40 mCi. Las dosis de tratamiento ablativo único efectivo (es decir, que puede requerir trasplante autólogo de médula ósea) de anticuerpos anti-EGFR marcados con yodo131 están en el rango entre alrededor de 30 y alrededor de 600 mCi, más preferiblemente entre alrededor de 50 y menos de alrededor de 500 mCi. En conjunto con un anticuerpo anti-EGFR quimérico, debido a la vida media en circulación más larga de anticuerpos murinos vis a vis, una dosis de tratamiento ablativo único efectivo que no sea de médula con anticuerpos anti-EGFR quimérico marcados con yodo131 están en el rango entre alrededor de 5 y alrededor de 40 mCi, más preferiblemente inferior a alrededor de 30 mCi. Los criterios de imagen para, por ejemplo, el marcaje con indio111, es normalmente inferior a alrededor de 5 mCi.

Respecto al radiomarcaje con anticuerpos anti-EGFR, la terapia con ellos puede ocurrir también utilizando un tratamiento de terapia única o utilizando tratamientos múltiples. Debido al componente de radionúclido, es preferible que antes del tratamiento, las células madre periféricas ("PSC") o de médula ósea ("BM") se "recojan" de pacientes que puedan padecer potencialmente una toxicidad fatal de la médula ósea debido a la radiación. Se recoge la BM y/o PSC utilizando técnicas estándar, y después se purga y se congela para una posible reinfusión. Adicionalmente, es más preferible que antes del tratamiento se realice un estudio en el paciente de dosimetría diagnóstica utilizando un anticuerpo de diagnóstico marcado (por ejemplo, utilizando indio111), cuyo propósito es asegurar que el anticuerpo terapéuticamente marcado (por ejemplo, utilizando itrio90) no se "concentre" innecesariamente en ningún órgano o tejido normal.

En una realización preferida, la descripción está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que posee una secuencia de aminoácidos mostrada en la siguiente TABLA 7. En una realización preferida, la descripción está dirigida a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia mostrada en la siguiente TABLA 6. La descripción está dirigida también a un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia idéntica en al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con una secuencia de nucleótidos mostrada en la siguiente TABLA 6. En otros aspectos, la descripción puede excluir cualquiera de las secuencias de nucleótidos en la TABLA 6. En otra realización, la descripción dirigida con un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que posee una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con una secuencia de aminoácidos en la TABLA 7. La descripción también abarca un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que posee la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las construcciones en la TABLA 7 con sustituciones de aminoácido conservativas. La descripción también abarca un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las construcciones de la TABLA 7. La descripción también abarca un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácido idéntica en al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a una secuencia de aminoácidos en la TABLA 7. La descripción también abarca un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las construcciones de la TABLA 7 con sustituciones de aminoácidos conservativas. En otros aspectos, la descripción puede excluir cualquiera de las secuencias de aminoácido de la TABLA 7.

TABLA 6

CONSTRUCCIÓN	SECUENCIA DE NUCLEÓTIDO	Id. de Sec. N°
ICR62 VH	CAGGTC AALCCTACCTG CAGTCTGGGGCTGCACCTGGT GAAGCCTGGGGCCTCTGTGAAGTTGTCTTGCAAAG GTTCTGGTTTTACATTCACCTGACTACAAGATACAC TGGGTGAAGCAGAGTCATGGAAAGAGCCTTGAAGT GGATTGGGTATTTTAATCCTAACAGTGGTTATAGT ACCTACAATGAAAAGTTCAAGAGCAAGGCCAGAT TGACTGCAGACAAATCCACCGATACAGCCTATATG GAGCTTACCAGTCTGACATCTGAGGACTCTGCAAC CTATTACTGTACAAGACTATCCCCAGGGGGTTACT ATGTTATGGATGCCTGGGGTCAAGGAGCTTCAGTC ACTGTCTCCTC	2

I-HHA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAG GCTTCTGGATTTACATTCACTGACTACGCCATCAG CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGAGGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAG TACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACC ATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	4
I-HHB	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAG GGTTCTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATACA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGATATTTCAACCCTAACAGCGGTTATAG TACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACC ATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	6
I-HHC	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAG GGTTCTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATACA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGATATTTCAACCCTAACAGCGGTTATAG TACCTACAATGAAAAGTTCAAGAGCAGGGTCACC ATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	8
I-HLA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGGCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTTTACATTCACTGACTACTATATGCA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGCTGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAG TACCTACGCACAGAAGTTTCAGGGCAGGGTCACCA TGACCGCCGACACGTCCATCAGCACAGCCTACATG GAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCCG TGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTAC TATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGT GACCGTCTCCTCA	10
I-HLB	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGGTCTCTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATCC ACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGA GTGGATGGGATACTTCAACCCTAACAGCGGTTATA GTACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCAC CATGACCGCCGACACGTCCATCAGCACAGCCTACA TGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGCC CGTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTT ACTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACC GTGACCGTCTCCTCA	12

I-HLC	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGAGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAA GGTTCTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATCC ACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGA GTGGATGGGATACTTCAACCCTAACAGCGGTTACA GTACTTACAACGAGAAGTTCAAGAGCCGGGTCAC CATGACCGCCGACACGTCCATCAGCACAGCCTACA TGGAGCTGAGCAGGCTGAGATCTGACGACACGGC CGTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGGGGTT ACTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACC GTGACCGTCTCCTCA	14
I-HHD	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGTCTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAG GCCTCTGGTTTCACATTCACTGACTACAAGATACA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGATATTTCAACCCTAACAGCGGTTATAG TACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACC ATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	16
I-HHE	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGTCTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAG GGTTCTGGTTTCACATTCACTGACTACAAGATATC CTGGGTGCGACAGGCTCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGATATTTCAACCCTAACAGCGGTTATAG TACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACC ATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	18
I-HHF	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGTCTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAG GGTTCTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATACA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGATATTTCAACCCTAACAGCGGTTATTC GAACTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACC ATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	20
I-HHG	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGGTCTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAG GGTTCTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATACA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGATATTTCAACCCTAACAGCGGTTATGC CACGTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACC ATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	22

I-HLA1	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTTTACATTCACTGACTACTATATGCA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGCTGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAG TACCTACAGCCCAAGCTTCCAAGGCCAGGTCACCA TCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTG CAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCA TGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTAC TATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGT GACCGTCTCCTCA	24
I-HLA2	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTTTACATTCACTGACTACTATATGCA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGCTGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAG TACCTACAACGAGAAGTTCCAAGGCCAGGTCACC ATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCT GCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCC ATGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	26
I-HLA3	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTACACATTCACTGACTACTATATGC ACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGA GTGGATGGGCTGGATCAATCCTAACAGTGGTTATA GTACCTACAGCCCAAGCTTCCAAGGCCAGGTCACC ATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCT GCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCC ATGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	28
I-HLA4	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGAGCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTACACATTCACTGACTACTATATGC ACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGA GTGGATGGGCTGGATCAATCCTAACAGTGGTTATA GTACCTACAACGAGAAGTTCCAAGGCCAGGTCAC CATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACC TGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGC CATGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTT ACTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACC GTGACCGTCTCCTCA	30
I-HLA5	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCCAGAGGTGA AGAAGCCTGGAACCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTTTACATTCACTGACTACTATATGCA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGCTGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAG TACCTACAGCCCAAGCTTCCAAGGCCAGGTCACCA TCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTG CAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCA TGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTAC TATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGT GACCGTCTCCTCA	32

I-HLA6	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCAGAGGTGA AGAAGCCTGGAACCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTTTACATTCACTGACTACTATATGCA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGCTGGATCAATCCTAACAGTGGTTATAG TACCTACAACGAGAAGTTCCAAGGCCAGGTCACC ATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCT GCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCC ATGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	34
I-HLA7	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCAGAGGTGA AGAAGCCTGGAACCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATCC ACTGGGTGCGACAGGCCCGCGGACAACGGCTCGA GTGGATCGGCTGGATCAATCCTAACAGTGGTTATA GTACCTACAACGAGAAGTTCCAAGGCCAGGTCAC CATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACC TGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGC CATGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTT ACTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACC GTGACCGTCTCCTCA	36
I-HLA8	CAGATGCAGCTGGTGCAGTCTGGGCCAGAGGTGA AGAAGCCTGGAACCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAA GGCCTCTGGTTTTACATTCACTGACTACAAGATCC ACTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGA GTGGATGGGATATTTCAACCCTAACAGCGGTTATA GTACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCAC CATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTAC ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGG CCGTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGT TACTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCAC CGTGACCGTCTCCTCA	38
I-HLA9	GAGGTGCAGCTCGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGCGAGTCGTTGAAGATCTCCTGCAAG GGTTCTGGTTATTCATTCACTGACTACAAGATCCA CTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAG TGGATGGGATATTTCAACCCTAACAGCGGTTATAG TACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACC ATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACAT GGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCC GTGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTA CTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCG TGACCGTCTCCTCA	40
I-HLA10	GAGGTGCAGCTCGTGCAGTCTGGCGCTGAGGTGA AGAAGCCTGGCGAGTCGTTGAAGATCTCCTGCAAG GGTTCTGGTTATTCATTCACTGACTACAAGATCCA CTGGGTGCGACAGATGCCTGGAAAGGGCCTCGAG TGGATGGGCTACTTCAATCCTAACAGTGGTTATAG TACCTACAGCCCAAGCTTCCAAGGCCAGGTCACCA TCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTG CAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCA TGTATTACTGTGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTAC TATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGACCACCGT GACCGTCTCCTCAG	120

Secuencia señal VH	ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGC AGCAGCCACAGGAGCCCACTCC	42
ICR62 VL	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCITCATTCTGTCT GCATCTGTGGGAGACAGAGTCACTATCAACTGCAA AGCAAGTCAGAATATTAACAATTACTTAAACTGGT ATCAGCAAAAGCTTGGAGAAGCTCCCAAACGCCT GATATATAATACAAACAATTTGCAAACAGGCATCC CATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGAT TACACACTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGA TTTTGCCACATATTTCTGCTTGCAGCATAATAGTTT TCCCACGTTTGGAGCTGGGACCAAGCTGGAAGTGA AACGTACG	44
I-KC	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGTGCGGAGACCGGGTCACCATCACCTGCC GGGCAAGTCAGGGCATTAAACAATTACTTAAATTGG TACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCC TGATCTATAATACCAACAACCTTGACAGACAGGCGTC CCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCCGGGACAG AATTCACCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAA GATTTTGCCACCTATTACTGCTTGCAGCATAATAG TTTTCCCACGTTTGGCCAGGGCACCAAGCTCGAGA TCAAGCGTACG	46
Secuencia señal VL	ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGCCT CCTGCTGCTCTGGTTCCCAAGGTGCCAGGTGT	48
I-KA	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGTGCGGAGACCGGGTCACCATCACCTGCC GGGCAAGTCAGGGCATTAAACAATTACTTAAATTGG TACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCC TGATCTATAATACCAACAACCTTGACAGACAGGCGTC CCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCCGGGACAG AATACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAA GATTTTGCCACCTATTACTGCTTGCAGCATAATAG TTTTCCCACGTTTGGCCAGGGCACCAAGCTCGAGA TCAAGCGTACGGTG	50
I-KB	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTC TGCATCTGTGCGGAGACCGGGTCACCATCACCTGCA AAGCAAGTCAGAATATTAACAATTACTTAAACTGG TACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCC TGATCTATAATACCAACAACCTTGACAGACAGGCGTC CCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCCGGGACAG AATACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAA GATTTTGCCACCTATTACTGCTTGCAGCATAATAG TTTTCCCACGTTTGGCCAGGGCACCAAGCTCGAGA TCAAGCGTACGGTG	52

TABLA 7

CONSTRUCCIÓN	SECUENCIA DE AMINOÁCIDO	Id. de Sec. Nº
ICR62 VH	QVNLLQSGAALVKPGASVKLSCKGSGFTFTDYKIHVVK QSHGKSLEWIGYFNPNSGYSTYNEKFKSKATLTADKSTD TAYMELTSLSSEDSATYYCTRLSPGGYYVMDAWGQGA SVTVSS	1

I-HHA	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTDYAISWVR QAPGQGLEWMGGINPNSGYSTYAQKFQGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDNAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG TTVTVSS	3
I-HHB	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKSGSFTFTDYKIHWR QAPGQGLEWMGYFNPNNSGYSTYAQKFQGRVTITADKST STAYMELSSLRSEDNAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG TTVTVSS	5
I-HHC	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKSGSFTFTDYKIHWR</u> <u>QAPGQGLEWMGYFNPNNSGYSTYNEKFKSRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDNAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG</u> <u>TTVTVSS</u>	7
I-HLA	<u>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTDYMHWR</u> <u>ROAPGQGLEWMGWINPNSGYSTYAOKFOGRVTMTADT</u> <u>SISTAYMELSLRSDDTAVYYCARLSPGGYYVMDAWGO</u> <u>GTTVTVSS</u>	9
1-HLB	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKSGSFTFTDYKIHWR QAPGQGLEWMGYFNPNNSGYSTYAQKFQGRVTMTADTSI STAYMELSLRSDDTAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG TTVTVSS	11
I-HLC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKSGSFTFTDYKIHWR QAPGQGLEWMGYFNPNNSGYSTYNEKFKSRVTMTADTSI STAYMELSLRSDDTAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG TTVTVSS	13
I-HHD	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTDYKIHWR</u> <u>QAPGQGLEWMGYFNPNNSGYSTYAOKFOGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDNAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG</u> <u>TTVTVSS</u>	15
I-HHD-1	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFTDYKIHWR</u> <u>QAPGQGLEWMGYFNPNNSGYSTYAOKFOGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDNAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG</u> <u>TTVTVSS</u>	128
I-HHD-2	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFSFTDYKIHWR</u> <u>QAPGQGLEWMGYFNPNNSGYSTYAOKFOGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDNAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG</u> <u>TTVTVSS</u>	129
I-HHD-3	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTITDYKIHWR</u> <u>QAPGQGLEWMGYFNPNNSGYSTYAOKFOGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDNAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG</u> <u>TTVTVSS</u>	130
I-HHD-4	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTEYKIHWR</u> <u>QAPGQGLEWMGYFNPNNSGYSTYAOKFOGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDNAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG</u> <u>TTVTVSS</u>	131
I-HHD-5	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTDYKIHWR</u> <u>QAPGQGLEWMGYFTPNNSGYSTYAOKFOGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDNAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG</u> <u>TTVTVSS</u>	132
I-HHD-6	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTDYKIHWR</u> <u>QAPGQGLEWMGYFNANSGYSTYAOKFOGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDNAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG</u> <u>TTVTVSS</u>	133
I-HHD-7	<u>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTDYKIHWR</u> <u>QAPGQGLEWMGYFNPNISGYSTYAOKFOGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDNAVYYCARLSPGGYYVMDAWGOGT</u> <u>TTVTVSS</u>	134

I-HHD-8	<u>QVOLVOSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTDYKIHWR</u> <u>QAPGOGLEWMGYFNPNSGTSTYAOKFOGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDТАVYYCARLSPGGYYVMDAWGOG</u> <u>TTVTVSS</u>	135
I-HHD-9	<u>QVOLVOSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTDYKIHWR</u> <u>QAPGOGLEWMGYFNPNSGYATYAOKFOGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDТАVYYCARLSPGGYYVMDAWGOG</u> <u>TTVTVSS</u>	136
I-HHD-10	<u>QVOLVOSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTDYKIHWR</u> <u>QAPGOGLEWMGYFNPNSGYSTYAOKFOGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDТАVYYCARLSPGGYYGMDAWGOG</u> <u>TTVTVSS</u>	137
I-HHD-11	<u>QVOLVOSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFTDYKIHWR</u> <u>QAPGOGLEWMGYFNPNSGYSTYAOKFOGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDТАVYYCARLSPGGYYVMDVWGOG</u> <u>TTVTVSS</u>	138
I-HHE	<u>QVOLVOSGAEVKKPGSSVKVSCKGSGFTFTDYKISWR</u> <u>QAPGOGLEWMGYFNPNSGYSTYAOKFOGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDТАVYYCARLSPGGYYVMDAWGOG</u> <u>TTVTVSS</u>	17
I-HHF	<u>QVOLVOSGAEVKKPGSSVKVSCKGSGFTFTDYKIHWR</u> <u>QAPGOGLEWMGYFNPNSGYSNYAOKFOGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDТАVYYCARLSPGGYYVMDAWGOG</u> <u>TTVTVSS</u>	19
I-HHG	<u>QVOLVOSGAEVKKPGSSVKVSCKGSGFTFTDYKIHWR</u> <u>QAPGOGLEWMGYFNPNSGYATYAOKFOGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDТАVYYCARLSPGGYYVMDAWGOG</u> <u>TTVTVSS</u>	21
I-HLA1	<u>QVOLVOSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTDYMHWR</u> <u>ROAPGOGLEWMGWNPNSGYSTYSPSFOGOVTISADKSI</u> <u>STAYLOWSSLKASDTAMYCARLSPGGYYVMDAWGO</u> <u>GTTVTVSS</u>	23
I-HLA2	<u>QVOLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTFTDYMHWR</u> <u>RQAPGOGLEWMGWNPNSGYSTYNEKFQGGQVTISADKS</u> <u>ISTAYLQWSSLKASDTAMYCARLSPGGYYVMDAWGQ</u> <u>GTTVTVSS</u>	25
I-HLA3	<u>QVOLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYMHWR</u> <u>RQAPGOGLEWMGWNPNSGYSTYSPSFQGGQVTISADKSI</u> <u>STAYLQWSSLKASDTAMYCARLSPGGYYVMDAWGQ</u> <u>GTTVTVSS</u>	27
I-HLA4	<u>QVOLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYMHWR</u> <u>RQAPGOGLEWMGWNPNSGYSTYNEKFQGGQVTISADKS</u> <u>ISTAYLQWSSLKASDTAMYCARLSPGGYYVMDAWGQ</u> <u>GTTVTVSS</u>	29
I-HLA5	<u>QMOLVOSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFTDYMHWR</u> <u>ROAPGOGLEWMGWNPNSGYSTYSPSFOGOVTISADKSI</u> <u>STAYLOWSSLKASDTAMYCARLSPGGYYVMDAWGO</u> <u>GTTVTVSS</u>	31
I-HLA6	<u>QMOLVOSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFTDYMHWR</u> <u>ROAPGOGLEWMGWNPNSGYSTYNEKFQGGQVTISADKS</u> <u>ISTAYLOWSSLKASDTAMYCARLSPGGYYVMDAWGO</u> <u>GTTVTVSS</u>	33
I-HLA7	<u>QMOLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFTDYKIHWR</u> <u>QARGQRLEWIGWINPNSGYSTYNEKFQGGQVTISADKSIS</u> <u>TAYLQWSSLKASDTAMYCARLSPGGYYVMDAWGQG</u> <u>TTVTVSS</u>	35

I-HLA8	QMLVQSGPEVKKPGT SVKVSCKASGFTFTDYKIHWR QAPGQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTTTADKST STAYMELSSLRSED TAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQG TTVTVSS	37
I-HLA9	<u>EVOLVOSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYKIHWRQ</u> <u>APGQGLEWMGYFNPNSGYSTYAQKFQGRVTTTADKSTS</u> <u>TAYMELSSLRSED TAVYYCARLSPGGYYVMDAWGOGT</u> TVTVSS	39
I-HLA10	<u>EVOLVOSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYKIHWRQ</u> <u>MPGKGLEWMGYFNPNSGYSTYSPSFQGOVTISADKSIST</u> <u>AYLOWSSLKASDTAMYYCARLSPGGYYVMDAWGOGT</u> TVTVSS	121
Secuencia señal VH	MDWTWRILFLVAAATGAHS	41
ICR62 VL	<u>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTINCKASONNNYNLWYQQK</u> <u>LGEAPKRLIYNTNNLQTGPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQP</u> EDFATYFCLQHNSFPTFGAGTKLEIKRT	43
I-KC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTICRASQGINNYLNWYQQK PGKAPKRLIYNTNNLQTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQP EDFATYYCLQHNSFPTFGQGTKLEIKRT	45
I-KC1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTICRASQGINNYLNWYQQK PGKAPKRLIYNTNNLQTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQP EDFATYYCLQHNSFPTFGQGTKLEIKRT	139
I-KC2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTICRASQGINNWLWYQQK PGKAPKRLIYNTNNLQTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQP EDFATYYCLQHNSFPTFGQGTKLEIKRT	140
I-KC3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTICRASQGINNYLGWYQQK PGKAPKRLIYNTNNLQTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQP EDFATYYCLQHNSFPTFGQGTKLEIKRT	141
I-KC4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTICRASQGINNYLNWYQQK PGKAPKRLIYNTNNLQTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQP EDFATYYCLQHNSFPTFGQGTKLEIKRT	142
I-KC5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTICRASQGINNYLNWYQQK PGKAPKRLIYNANLQTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQP EDFATYYCLQHNSFPTFGQGTKLEIKRT	143
I-KC6	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTICRASQGINNYLNWYQQK PGKAPKRLIYNTSNLQTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQP EDFATYYCLQHNSFPTFGQGTKLEIKRT	144
I-KC7	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTICRASQGINNYLNWYQQK PGKAPKRLIYNTNSLQTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQP EDFATYYCLQHNSFPTFGQGTKLEIKRT	145
I-KC8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTICRASQGINNYLNWYQQK PGKAPKRLIYNTNNLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQP EDFATYYCLQHNSFPTFGQGTKLEIKRT	146
I-KC9	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTICRASQGINNYLNWYQQK PGKAPKRLIYNTNNLQTGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQP EDFATYYCLQHNSYPTFGQGTKLEIKRT	147
Secuencia señal VL	MDMRVPAQLLGLLLWFP GARC	47
I-KA	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTICRASQGINNYLNWYQQK PGKAPKRLIYNTNNLQTGVPSRFSGSGSGTEYTLTISSLQ PEDFATYYCLQHNSFPTFGQGTKLEIKRTV	49

I-KB	DIQMTQSPSSLSASVGVDRVTITCKASQNNINNYLNWYQQK PGKAPKRLIYNTNNLQGTGVPSTRFSGSGSGTEYTLTISSLQ PEDFATYYCLQHNSTFTFGQGTKLEIKRTV	51
------	---	----

La descripción también contempla una molécula de unión a antígeno que comprende una región variable quimérica de cadena pesada (por ejemplo, humanizada) que comprende una CDR específica de EGFR emparejada con una región variable de cadena ligera, en el que la región variable de cadena ligera posee menos de diez residuos de aminoácido no humanos. En otras realizaciones, la región variable de cadena ligera posee menos de nueve, ocho, siete, seis, cinco, cuatro, tres, dos, o un residuo de aminoácido humano. En realizaciones preferidas, la región variable de cadena ligera posee menos de dos o menos de una (es decir, sin) residuos de aminoácido no humanos. En una realización, la región variable de cadena ligera comprende una o más secuencias génicas de región variable de línea germinal humana. Las secuencias génicas de región variable de línea germinal humana que codifican las regiones variables de la cadena ligera son conocidas en la materia, y pueden encontrarse, por ejemplo, en la base de datos IMGT, disponible en <http://imgt.eines.fr/home.html>. En una realización preferida, la secuencia de línea germinal humana deriva de la secuencia de línea germinal VK1_6. En otras realizaciones, los residuos de aminoácido dentro de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de línea germinal humana pueden sustituirse con uno o más residuos de otra secuencia de región variable de cadena ligera de línea germinal humana.

En una realización, la descripción está dirigida a una molécula de unión a antígeno que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°:1; Id. de Sec. N°:3; Id. de Sec. N°:5; Id. de Sec. N°:7; Id. de Sec. N°:9; Id. de Sec. N°:11; Id. de Sec. N°:13; Id. de Sec. N°:15; Id. de Sec. N°:17; Id. de Sec. N°:19; Id. de Sec. N°:21; Id. de Sec. N°:23; Id. de Sec. N°:25; Id. de Sec. N°:27; Id. de Sec. N°:29; Id. de Sec. N°:31; Id. de Sec. N°:33; Id. de Sec. N°:35; Id. de Sec. N°:37; Id. de Sec. N°:39; e Id. de Sec. N°: 121, y una cadena ligera que comprende un polipéptido codificado por uno o más secuencias génicas de región variable de línea germinal humana. En una realización preferida, la secuencia de línea germinal humana deriva de la secuencia de línea germinal VK1_6.

En otra realización, la descripción está dirigida a una molécula de unión a antígeno que comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en: Id. de Sec. N°:54, Id. de Sec. N°:56, Id. de Sec. N°:58, Id. de Sec. N°:60, Id. de Sec. N°:62, Id. de Sec. N°:64, Id. de Sec. N°:66, Id. de Sec. N°:68, Id. de Sec. N°:70, Id. de Sec. N°:72, Id. de Sec. N°:74, Id. de Sec. N°:122, e Id. de Sec. N°:124; (b) una secuencia seleccionada de un grupo que consiste en: Id. de Sec. N°:76, Id. de Sec. N°:78, Id. de Sec. N°:80, Id. de Sec. N°:82, Id. de Sec. N°:84, Id. de Sec. N°:86, Id. de Sec. N°:88, Id. de Sec. N°:90, Id. de Sec. N°:92, Id. de Sec. N°:94, Id. de Sec. N°: 96, Id. de Sec. N°:98, Id. de Sec. N°:100, Id. de Sec. N°:102, Id. de Sec. N°:104, Id. de Sec. N°:106, e Id. de Sec. N°:126; (c) Id. de Sec. N°:108; y (d) un polipéptido que comprende una región variable de cadena ligera humana codificada por una o más secuencias génicas de línea germinal humana. En una realización particular, la secuencia de línea germinal humana deriva de la VK1_6 secuencia de línea germinal. En otra realización, la secuencia génica de línea germinal humana comprende la secuencia génica de línea germinal VK1_6 con una sustitución de uno o más codones de aminoácido con una secuencia de una secuencia génica de región variable de cadena ligera de línea germinal humana diferente.

En otras realizaciones, la molécula de unión a antígeno de la descripción comprende una región variable de cadena pesada específica de EGFR descrita en este documento, y una variante de Id. De Sec. N°: 45. En una realización, la variante de Id. de Sec. N°:45 comprende una sustitución de aminoácidos en una o más posiciones en las regiones determinantes de complementariedad (CDR). En realizaciones específicas, la sustitución es de un residuo de aminoácido en una posición seleccionada entre el grupo que consiste en: posición de aminoácido 30 de Id. de Sec. N°:45; posición de aminoácido 32 de Id. de Sec. N°:45; posición de aminoácido 34 de Id. de Sec. N°:45; posición de aminoácido 50 de Id. de Sec. N°:45; posición de aminoácido 51 de Id. de Sec. N°:45; posición de aminoácido 52 de Id. de Sec. N°:45; posición de aminoácido 53 de Id. de Sec. N°:45; posición de aminoácido 56 de Id. de Sec. N°:45; posición de aminoácido 94 de Id. de Sec. N°:45; y cualquier combinación de sustituciones de las mismas. En realizaciones más específicas, la sustitución en Id. de Sec. N°:45 se selecciona del grupo que consiste en: sustitución de una arginina (R) por asparagina (N) en la posición 30 de Id. de Sec. N°:45; sustitución de un triptófano (W) por la tirosina (Y) en la posición 32 de Id. de Sec. N°:45; sustitución de una glicina (G) por la asparagina (N) en la posición 34 de Id. de Sec. N°:45; sustitución de una treonina (T) por la asparagina (N) en la posición 50 de Id. de Sec. N°:45; sustitución de una alanina (A) por la treonina (T) en la posición 51 de Id. de Sec. N°:45; sustitución de una serina (S) por la asparagina (N) en la posición 52 de Id. de Sec. N°:45; sustitución de una serina (S) por la asparagina (N) en la posición 53 de Id. de Sec. N°:45; sustitución de una serina (S) por la treonina (T) en la posición 56 de Id. de Sec. N°:45; sustitución de una tirosina (Y) por la fenilalanina (F) en la posición 94 de Id. de Sec. N°:45; y cualquier combinación de las mismas. En una realización particular, todas estas sustituciones de residuos de aminoácido en Id. de Sec. N°:45 se incorporan en una variante de cadena ligera única. En realizaciones preferidas, las moléculas de unión a antígeno que comprenden las variantes de cadena ligera con sustituciones de aminoácidos para la CDR ICR62 retienen la unión específica a EGFR (en comparación con una molécula de unión a antígeno que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de Id. de Sec. N°:45) cuando la variante de cadena ligera está emparejada con un polipéptido que comprende una región variable de la cadena pesada de la presente invención. La descripción también está dirigida a polinucleótidos que codifican cualquiera de

los anteriores polipéptidos y/o moléculas de unión a antígeno, y células huésped y/o vectores que comprenden los polinucleótidos y/o polipéptidos. La descripción está dirigida también a las moléculas de unión a antígeno descritas anteriormente, con un transportador farmacéuticamente aceptable.

La descripción también contempla una molécula de unión a antígeno que comprende una región variable de cadena pesada humana que comprende CDR específica de EGFR, en el que la región variable de cadena pesada posee menos de diez residuos de aminoácido no humanos, y en el que la molécula de unión a antígeno específicamente se une a EGFR. En otras realizaciones, la región variable de cadena pesada posee menos de nueve, ocho, siete, seis, cinco, cuatro, tres, dos, o un residuo de aminoácido no humano. En realizaciones preferidas, la región variable de cadena ligera posee menos de cinco residuos de aminoácido no humanos. En una realización, la región variable de cadena pesada comprende una o más secuencias génicas de región variable de línea germinal humana. Las secuencias génicas de región variable de línea germinal humana que codifican regiones variables de cadena pesada son conocidas en la materia, y pueden encontrarse en, por ejemplo, la base de datos IMGT, disponible en <http://imgt.eines.fr/home.html>. En una realización, la secuencia de línea germinal humana deriva de la secuencia de línea germinal VH1_10. En otras realizaciones, los residuos de aminoácido dentro de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de línea germinal humana pueden sustituirse con uno o más residuos de otra secuencia de la región variable de la cadena pesada de la línea germinal humana. En realizaciones preferidas, las moléculas de unión a antígeno que comprenden las variantes de cadena pesada con sustituciones de aminoácidos en la CDR ICR62 de la cadena pesada retienen la unión específica a EGFR cuando la variante de cadena pesada está emparejada con un polipéptido que comprende una región variable de cadena ligera que se une a EGFR (por ejemplo una región variable de cadena ligera de la presente invención). La descripción también está dirigida a polinucleótidos que codifican cualquiera de los anteriores polipéptidos y/o moléculas de unión a antígeno, y células huésped y/o vectores que comprenden los polinucleótidos y/o polipéptidos. La descripción está dirigida también a las moléculas de unión a antígeno descritas anteriormente, con un transportador farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, la descripción está dirigida a un vector de expresión y/o una célula huésped que comprende uno o más polinucleótidos aislados descritos en este documento.

En general, cualquier tipo de línea celular cultivada puede utilizarse para expresar la ABM de la presente invención. En una realización preferida, se utilizan células HEK293-EBNA, células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, otras células de mamífero, células de levadura, células de insecto o células vegetales como molde de la línea celular para generar las células huésped modificadas como se ha descrito en este documento.

La eficacia terapéutica de las ABM descritas en este documento puede aumentarse produciéndolas en una célula huésped que exprese además un polinucleótido que codifica un polipéptido con actividad GnTIII. En una realización preferida, el polipéptido que posee actividad GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente en Golgi. En otra realización preferida, la expresión de las ABM de la presente invención en una célula huésped que expresa un polinucleótido que codifica un polipéptido que posee actividad GnTIII resulta en ABM con aumento de la afinidad de unión al receptor Fc y aumento de la función efectora. De acuerdo con esto, en una realización, la descripción está dirigida a una célula huésped que comprende (a) un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un polipéptido con actividad GnTIII; y (b) un polinucleótido aislado que codifica una ABM de la presente invención, como un anticuerpo quimérico, primatizado o humanizado que se une a EGFR humano. En una realización preferida, el polipéptido que posee actividad GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio catalítico de GnTIII y el dominio de localización Golgi es el dominio de localización de manosidasa II. Los métodos para generar dichos polipéptidos de fusión y utilizarlos para producir anticuerpos con funciones efectoras aumentadas están descritos en Sol. de Pat. Provisional Estadounidense N° 60/495.142 y Sol. de Pat. Provisional Estadounidense N° 2004/0241817 A1. En otra realización preferida, la ABM quimérica es un anticuerpo quimérico o un fragmento de la misma, que posee la especificidad de unión del anticuerpo de rata ICR62. En una realización particularmente preferida, el anticuerpo quimérico comprende un Fc humano, en otra realización preferida, el anticuerpo está primatizado o humanizado.

En una realización, uno o varios polinucleótidos que codifican una ABM descrita en este documento puede expresarse bajo el control de un promotor constitutivo o, alternativamente, un sistema de expresión regulado. Los sistemas de expresión regulados adecuados incluyen, pero no se limitan a, un sistema de expresión regulado de tetraciclina, un sistema de expresión inducible de ecdisona, un sistema de expresión de cambio de lac, un sistema de expresión inducible por glucocorticoides, un sistema de promotor inducible por temperatura, y un sistema de expresión inducible por metalotioneina metálica. Si varios ácidos nucleicos diferentes que codifican una ABM como se ha descrito en este documento están comprendidos dentro del sistema de célula huésped, alguno de ellos puede expresarse bajo el control de un promotor constitutivo, mientras que otros se expresan bajo el control de un promotor regulado. El máximo nivel de expresión se considera el nivel más alto posible de expresión estable de polipéptido que no posee un efecto adverso significativo sobre la tasa de crecimiento, y se determinará utilizando experimentos rutinarios. Los niveles de expresión se determinan mediante métodos generalmente conocidos en la materia, que incluyen análisis Western blot utilizando un anticuerpo específico para la ABM o un anticuerpo específico para una cola peptídica fusionada con la ABM; y análisis Northern blot. En una alternativa, el polinucleótido puede estar

operativamente unido a un gen marcador; los niveles de expresión de una ABM quimérica (por ejemplo, humanizada) que posee sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo de rata ICR62 se determina midiendo una señal correlacionada con el nivel de expresión del gen marcador. El gen marcador puede transcribirse junto con los ácidos nucleicos que codifican dicho polipéptido de fusión como una molécula de mRNA única; sus correspondientes secuencias codificantes pueden estar unidas mediante un lugar de entrada a ribosoma interno (IRES) o mediante un potenciador de la traducción independiente del extremo (CITE). El gen marcador puede traducirse junto con al menos un ácido nucleico que codifica una ABM quimérica (por ejemplo, humanizada) que posee sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo de rata ICR62 de forma que se forma una única cadena de polipéptido. Los ácidos nucleicos que codifican las ABM de la presente invención pueden estar operativamente unidas al gen marcador bajo el control de un promotor único, de forma que el ácido nucleico que codifica el polipéptido de fusión y el gen marcador se transcriben en una molécula de RNA que está alternativamente cortada en dos moléculas mensajeras de RNA separadas (mRNA); uno de los mRNA resultantes se traduce en dicha proteína marcadora, y la otra se traduce en dicho polipéptido de fusión.

Los métodos que son bien conocidos por los expertos en la materia pueden utilizarse para construir vectores de expresión que contienen la secuencia codificante de una ABM que posee sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo de rata ICR62 junto con señales de control transcripcional/traduccionales apropiadas. Estos métodos incluyen técnicas de DNA recombinante in vitro, técnicas de síntesis y técnicas de recombinación/genéticas in vivo. Véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis et al., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989) y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y (1989).

Una serie de sistemas de expresión huésped-vector puede utilizarse para expresar la secuencia codificante de las ABM de la presente invención. Preferiblemente, se utilizan células de mamífero como sistemas de células huésped transfectadas con vectores de expresión recombinantes de DNA plasmídico o DNA cosmídico que contienen la secuencia codificante de la proteína de interés y la secuencia codificante del polipéptido de fusión. Más preferiblemente, las células HEK293-EBNA, células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, otras células de mamífero, células de levadura, células de insecto, o células vegetales se utilizan como sistema de células huésped. Algunos ejemplos de sistemas de expresión y métodos de selección se describen en las siguientes referencias, y las referencias contenidas en ellas: Borth et al., *Biotechnol. Bioeng.* 71(4):266-73 (2000-2001), en Werner et al., *Arzneimittelforschung/Drug Res.* 48(8):870-80 (1998), en Andersen y Krummen, *Curr. Op. Biotechnol.* 13:117-123 (2002), en Chadd y Chamow, *Curr. Op. Biotechnol.* 12:188-194 (2001), y en Giddings, *Curr. Op. Biotechnol.* 12: 450-454 (2001). En realizaciones alternativas, pueden utilizarse otros sistemas de células huésped eucariotas, que incluyen células de levadura transformadas con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen la secuencia codificante de una ABM descrita en este documento, como los sistemas de expresión descritos en la Sol. de Pat. Estadounidense N° 60/344,169 y WO 03/056914 (métodos para producir glicoproteína similar a la humana en una célula huésped eucariota no humana), sistemas de células de insectos con vectores de expresión recombinantes de virus (por ejemplo, baculovirus) que contiene la secuencia codificante de una ABM quimérica que posee sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo de rata ICR62; sistemas celulares de plantas infectadas con vectores de expresión recombinantes de virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformada con vectores de expresión recombinantes de plásmido (por ejemplo, plásmido Ti) que contiene la secuencia codificante de la ABM de la invención, que incluye, pero no se limita a, los sistemas de expresión descritos en la Patente Estadounidense N° 6.815.184 (métodos para la expresión y secreción de polipéptidos biológicamente activos a partir de lentejas de agua genéticamente modificadas); WO 2004/057002 (producción de proteínas glicosiladas en células vegetales briófitas mediante la introducción de un gen de la glicosil transferasa) y WO 2004/024927 (métodos para generar proteína no vegetal heteróloga extracelular en protoplasto de musgo); y Sol. de Pat. Estadounidense N° 60/365.769, 60/368.047, y WO 2003/078614 (procesamiento de glicoproteína en plantas transgénicas que comprenden una enzima de mamífero GnTIII funcional); o sistemas de células animales infectadas con vectores de expresión recombinantes de virus (por ejemplo, adenovirus, virus de la vacuna) que incluyen líneas celulares modificadas para contener múltiples copias del DNA que codifica una ABM quimérica que posee sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo de rata ICR62 ya sea amplificado de forma estable (CHO/dhfr) o amplificado de forma inestable en cromosomas de doble minuto (por ejemplo, líneas celulares murinas). En una realización, el vector que comprende los polinucleótido(s) que codifican la ABM de la invención es policistrónico. También, en una realización la ABM discutida anteriormente es un anticuerpo o un fragmento de la misma. En una realización preferida, la ABM es un anticuerpo humanizado.

Para los métodos descritos en este documento, la expresión estable se prefiere generalmente para la expresión transitoria debido a que normalmente se logran resultados más reproducibles y también es más fácil en la producción a gran escala. En lugar de utilizar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, las células huésped pueden transformarse con los correspondientes ácidos nucleicos codificantes controlados mediante elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, lugares de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Tras la introducción de DNA extraño, las células modificadas pueden dejarse que crezcan 1-2 días en un medio enriquecido, y después se cambian en un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia en la

selección y permite la selección de células que han integrado de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crecen para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares.

Pueden utilizarse una serie de sistemas de selección, que incluyen, pero no se limitan a, genes de la timidina quinasa de virus herpes simplex (Wigler et al., Cell 11:223 (1977)), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026 (1962)), y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy et al., Cell 22:817 (1980)), que pueden utilizarse en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. También, puede utilizarse genes de resistencia a antimetabolitos como base de selección para dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA 77:3567 (1989); O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981)); gpt, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G- 418 (Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150:1 (1981)); e hygro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre et al., Gene 30:147 (1984)). Recientemente, se han descrito genes seleccionables adicionales, denominados trpB, que permiten a las células utilizar indol en lugar de triptófano; hisD, que permite a las células utilizar histinol en lugar de histidina (Hartman & Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047 (1988)); el sistema de glutamina sintasa; y ODC (ornitina descarboxilasa) que confiere resistencia al inhibidor de ornitina descarboxilasa, 2-(difluorometil)-DL-ornitina, DFMO (McConlogue, rn: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed. (1987)).

La descripción está dirigida también a un método para modificar el perfil de glicosilación de las ABM de la presente invención que están producidas por una célula huésped, que comprenden la expresión en dicha célula huésped un ácido nucleico que codifica una ABM descrita en este documento y un ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad GnTIII, o un vector que comprende dichos ácidos nucleicos. Preferiblemente, el polipéptido modificado es una IgG o un fragmento de la misma que comprende la región Fc. En una realización particularmente preferida la ABM es un anticuerpo humanizado o un fragmento de la misma. En otra realización, el método comprende además la expresión en la célula huésped un ácido nucleico que codifica un polipéptido con una segunda actividad glicosiltransferasa. En una realización específica, la segunda actividad glicosiltransferasa es manosidasa II (ManII).

Las ABM modificadas producidas por las células huésped de la invención presentan un aumento de la afinidad de unión al receptor Fc y/o un aumento de la función efectora como resultado de la modificación. En una realización particularmente preferida la ABM es un anticuerpo humanizado o un fragmento del mismo que contiene la región Fc. Preferiblemente, un aumento de la afinidad de unión al receptor Fc es un aumento de la unión al receptor activador de Fc γ , como el receptor Fc γ RIIIa. El aumento en la función efectora es preferiblemente un aumento en uno o más de los siguientes: aumento de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, aumento de la fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (FCDA), aumento de la secreción de citoquinas, aumento de la captación de antígeno mediada por inmunocomplejos por células presentadoras de antígeno, aumento de la citotoxicidad celular mediada por Fc, aumento de la unión a células NK, aumento de la unión a macrófagos, aumento de la unión a células polimorfonucleares (PMN), aumento de la unión a monocitos, aumento del entrecruzamiento de anticuerpos unidos a diana, aumento de la apoptosis inducida por señalización directa, aumento de la maduración de células dendríticas, y aumento de la primación de células T.

La descripción también está dirigida a un método para producir una ABM como se ha descrito en este documento, con oligosacáridos modificados en una célula huésped que comprende (a) cultivar una célula huésped modificada para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que posee actividad GnTIII bajo condiciones que permiten la producción de una ABM de acuerdo con la descripción, en el que dicho polipéptido que posee actividad GnTIII se expresa en una cantidad suficiente para modificar los oligosacáridos en la región Fc de dicha ABM producida por dicha célula huésped; y (o) aislar dicha ABM. En una realización preferida, el polipéptido que posee actividad GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio catalítico de GnTIII. En una realización particularmente preferida, el polipéptido de fusión comprende además el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente en Golgi.

Preferiblemente, el dominio de localización Golgi es el dominio de localización de manosidasa II o GnTI. Alternativamente, el dominio de localización Golgi se selecciona del grupo que consiste en: el dominio de localización de manosidasa I, el dominio de localización de GnTII, y el dominio de localización de α 1-6 fucosiltransferasa central. Las ABM producidas por los métodos descritos en este documento poseen un aumento de la afinidad de unión al receptor Fc y/o aumento de la función efectora. Preferiblemente, el aumento en la función efectora es uno o más de los siguientes: aumento de la citotoxicidad celular mediada por Fc (que incluye aumento de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo), aumento de fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (FCDA), aumento de secreción de citoquinas, aumento de captación de antígeno mediada por inmunocomplejos por células presentadoras de antígeno, aumento de la unión a células NK, aumento de la unión a macrófagos, aumento de la unión a monocitos, aumento de la unión a células polimorfonucleares, aumento de la apoptosis inducida por señalización directa, aumento del entrecruzamiento de anticuerpos unidos a diana, aumento de la maduración de células dendríticas, o aumento de la primación de células T. El aumento de la afinidad de unión al receptor Fc es preferiblemente un aumento de la unión a receptores activadores de Fc como Fc γ RIIIa. En una realización particularmente preferida la ABM es un anticuerpo humanizado o un fragmento de la misma.

En otra realización, la descripción está dirigida a una ABM quimérica que posee sustancialmente la misma

especificidad de unión del anticuerpo de rata ICR62 producida por los métodos descritos en este documento que posee una proporción aumentada de oligosacáridos bisectados en la región Fc de dicho polipéptido. Se contempla que dicha ABM abarque anticuerpos y fragmentos de la misma que comprende la región Fc. En una realización preferida, la ABM es un anticuerpo humanizado. En una realización, el porcentaje de oligosacáridos bisectados en la región Fc de la ABM es de al menos un 50%, más preferiblemente, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, o al menos un 90%, y más preferiblemente al menos un 90-95% del total de oligosacáridos. En aún otra realización, la ABM producida por los métodos descritos en este documento posee una proporción aumentada de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc como resultado de la modificación de sus oligosacáridos mediante los métodos descritos en este documento. En una realización, el porcentaje de oligosacáridos no fucosilados es al menos un 50%, preferiblemente, al menos entre un 60% y un 70%, lo más preferible al menos un 75%. Los oligosacáridos no fucosilados pueden ser del tipo híbrido o en complejos. En una realización particularmente preferida, la ABM producida por las células huésped y los métodos descritos en este documento poseen una proporción aumentada de oligosacáridos no fucosilados, bisectados en la región Fc. Los oligosacáridos no fucosilados bisectados pueden ser del tipo híbrido o en complejos. Específicamente, los métodos descritos en este documento pueden utilizarse para producir ABM en el que al menos un 15%, más preferiblemente al menos un 20%, más preferiblemente al menos un 25%, más preferiblemente al menos un 30%, más preferiblemente al menos un 35% de los oligosacáridos en la región Fc de la ABM son bisectados, no fucosilados. Los métodos descritos en este documento pueden también utilizarse para producir polipéptidos en los que al menos un 15%, más preferiblemente al menos un 20%, más preferiblemente al menos un 25%, más preferiblemente al menos un 30%, más preferiblemente al menos un 35% de los oligosacáridos en la región Fc del polipéptido son bisectados híbridos no fucosilados.

En otra realización, la descripción está dirigida a un ABM quimérico que posee sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo de rata ICR62 modificado para tener un aumento de la función efectora y/o aumento de la afinidad de unión al receptor de Fc, producida por los métodos descritos en este documento. Preferiblemente, el aumento en la función efectora es uno o más de los siguientes: aumento de la citotoxicidad celular mediada por Fc (que incluyen aumento de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo), aumento de fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (FCDA), aumento de secreción de citoquinas, aumento de captación de antígeno mediado por inmunocomplejos por células presentadoras de antígeno, aumento de la unión a células NK, aumento de la unión a macrófagos, aumento de la unión a monocitos, aumento de la unión a células polimorfonucleares, aumento de la apoptosis inducida por señalización directa, aumento del entrecruzamiento de anticuerpos unidos a diana, aumento de la maduración de células dendríticas, o aumento de la primación de células T. En una realización preferida, el aumento de la afinidad de unión al receptor Fc es un aumento de la unión al receptor activador de Fc, más preferiblemente FcγRIIIa. En una realización, la ABM es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo que contiene la región Fc, o una proteína de fusión que incluye una región equivalente a la región Fc de una inmunoglobulina. En una realización particularmente preferida, la ABM es un anticuerpo humanizado.

La descripción está dirigida también a composiciones farmacéuticas que comprenden la ABM descrita en este documento y un transportador farmacéuticamente aceptable.

La descripción está dirigida también a dichas composiciones farmacéuticas para utilizar en el método de tratamiento del cáncer. Específicamente, la descripción está dirigida a una composición farmacéutica como se ha descrito en este documento para utilizar en un método para el tratamiento del cáncer.

La descripción proporciona además métodos para la generación y uso de sistemas de célula huésped para la producción de glicoformas de ABM como se ha descrito en este documento, con un aumento de la afinidad de unión por el receptor Fc, preferiblemente un aumento de la unión a los receptores activadores de Fc, y/o con un aumento de las funciones efectoras, que incluyen citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. La metodología de glicosilación que puede utilizarse con las ABM de la presente invención ha sido descrita en mayor detalle en la Patente Estadounidense N° 6.602.684, Publ. de Sol. de Pat. Estadounidense N° 2004/0241817 A1, Publ. de Sol. de Pat. Estadounidense N° 2003/0175884 A1, Solicitud Provisional de Pat. Estadounidense N° 60/441,307 y WO 2004/065540. Las ABM como se ha descrito en este documento pueden alternativamente estar glicosiladas para tener residuos de fucosa reducidos en la región Fc de acuerdo con las técnicas descritas en la Sol. de Pub. de Pat. Estadounidense N° 2003/0157108 (Genentech), o en PE 1 176 195 A1, WO 03/084570, WO 03/085119 y Publ. de Sol. de Pat. Estadounidense N° 2003/0115614, 2004/093621, 2004/110282, 2004/110704, 2004/132140 (Kyowa). Las ABM glicosiladas descritas en este documento pueden también producirse en sistemas de expresión que producen glicoproteínas modificadas, como las mostradas en la Sol. de Pub. de Pat. Estadounidense N° 60/344,169 y WO 03/056914 (GlycoFi, Inc.) o en WO 2004/057002 y WO 2004/024927 (Greenovation).

Generación de líneas celulares para la producción de proteínas con un patrón de glicosilación alterado

La descripción describe sistemas de expresión de células huésped para la generación de ABM de la presente invención que poseen patrones de glicosilación modificados. En particular, la descripción describe sistemas de célula huésped para la generación de glicoformas de ABM descritas en este documento que poseen un valor terapéutico mejorado. Por lo tanto, la descripción describe sistemas de expresión de células huésped seleccionados o modificados para expresar un polipéptido que posee actividad GnTIII. En una realización, el polipéptido que posee

actividad GnTIII es un polipéptido de fusión que comprende el dominio de localización Golgi de un polipéptido heterólogo residente en Golgi. Específicamente, dichos sistemas de expresión de células huésped pueden modificarse para comprender una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido que posee GnTIII, operativamente unido a un sistema promotor regulado o constitutivo.

En una realización específica, la descripción describe una célula huésped que ha sido modificada para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión que posee actividad GnTIII y que comprende el dominio de localización Golgi de un polipéptido heterólogo residente en Golgi. En un aspecto, la célula huésped está modificada con una molécula de ácido nucleico que comprende al menos un gen que codifica un polipéptido de fusión que posee actividad GnTIII y que comprende el dominio de localización Golgi de un polipéptido heterólogo residente en Golgi.

En otra realización, la célula huésped ha sido modificada para expresar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que posee actividad GnTIII y un segundo ácido nucleico que posee otra actividad glicosiltransferasa. En una realización particular, el segundo ácido nucleico codifica un polipéptido que posee actividad manosidasa (ManII).

En general, cualquier tipo de línea celular cultivada, que incluye las líneas celulares descritas anteriormente, pueden utilizarse como base para modificar las líneas celulares huésped de la presente invención. En una realización preferida, células HEK293-EBNA, células CHO, células BHK, células NS0, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, otras células de mamífero, células de levadura, células de insecto, o células vegetales se utilizan como línea celular de base para generar las células huésped modificadas descritas en este documento.

La descripción contempla abarcar cualquier célula huésped modificada que exprese un polipéptido que posea actividad GnTIII, que incluyen un polipéptido de fusión que comprende el dominio de localización Golgi de un polipéptido heterólogo residente en Golgi tal como se ha definido en este documento.

Puede expresarse uno o varios ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que posee actividad GnTIII bajo el control de un promotor constitutivo o, alternativamente, un sistema de expresión regulado. Dichos sistemas son bien conocidos en la materia, e incluye los sistemas descritos anteriormente. Si varios ácidos nucleicos diferentes que codifican polipéptidos de fusión que poseen actividad GnTIII y que comprenden el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente Golgi heterólogo están comprendidos dentro del sistema de célula huésped, alguno de ellos puede expresarse bajo el control de un promotor constitutivo, mientras que otros se expresan bajo el control de un promotor regulado. Los niveles de expresión de los polipéptidos de fusión que poseen actividad GnTIII se determinan mediante métodos generalmente conocidas en la materia, que incluyen análisis Western blot, análisis Northern blot, análisis de expresión de gen marcador o medición de la actividad GnTIII. Alternativamente, puede emplearse una lectina que se une a productos biosintéticos de GnTIII, por ejemplo, lectina E4-PHA. Alternativamente, puede utilizarse un ensayo funcional que mide el aumento de unión al receptor Fc o un aumento de la función efectora mediada por anticuerpos producido por las células modificadas con el ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad GnTIII.

Identificación de transfectantes o transformantes que expresan la proteína que posee un patrón de glicosilación modificado

Las células huésped que contienen la secuencia codificante de un ABM quimérico (por ejemplo, humanizado) que posee sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo de rata ICR62 y que expresa los productos génicos biológicamente activos pueden identificarse por al menos cuatro aproximaciones generales; (a) hibridación DNA-DNA o DNA-RNA; (b) la presencia o ausencia de funciones de gen "marcador"; (c) evaluar el nivel de transcripción medida mediante la expresión de los correspondientes transcritos de mRNA en la célula huésped; y (d) detección del producto génico medido mediante inmunoensayo o mediante su actividad biológica.

En la primera aproximación, la presencia de la secuencia codificante de una ABM quimérica (por ejemplo, humanizada) que posee sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo de rata ICR62 y la secuencia codificante del polipéptido que posee actividad GnTIII puede detectarse mediante hibridación DNA-DNA o DNA-RNA utilizando sondas que comprenden secuencias de nucleótido que son homólogas con las correspondientes secuencias codificantes, respectivamente, o porciones o derivados de las mismas.

En la segunda aproximación, el vector de expresión/ sistema huésped recombinante puede identificarse y seleccionarse en base a la presencia o ausencia de ciertas funciones de gen "marcador" (por ejemplo, actividad timidina quinasa, resistencia a antibióticos, resistencia a metotrexato, transformación de fenotipo, formación de cuerpos oclusivos en baculovirus, etc.). Por ejemplo, si la secuencia codificante de la ABM como se ha descrito en este documento, o un fragmento de la misma, y la secuencia codificante del polipéptido que posee actividad GnTIII se insertan dentro de una secuencia de gen marcador del vector, pueden identificarse recombinantes que contienen las correspondientes secuencias codificantes por la ausencia de la función del gen marcador. Alternativamente, puede colocarse un gen marcador en tándem con las secuencias codificantes bajo el control del mismo promotor o diferente que el utilizado para controlar la expresión de las secuencias codificantes. La expresión del marcador en

respuesta a la inducción o selección indica la expresión de la secuencia codificante de la ABM descrita en este documento y la secuencia codificante del polipéptido que posee actividad GnTIII.

En la tercera aproximación, la actividad transcripcional para la región codificante de la ABM descrita en este documento o un fragmento de la misma, y la secuencia codificante del polipéptido que posee actividad GnTIII puede analizarse mediante ensayos de hibridación. Por ejemplo, puede aislarse el RNA y analizarse mediante Northern blot utilizando una sonda homóloga a las secuencias codificantes de la ABM descrita en este documento, o un fragmento de la misma, y la secuencia codificante del polipéptido que posee actividad GnTIII o porciones particulares del mismo. Alternativamente, pueden extraerse los ácidos nucleicos totales de la célula huésped y analizarse la hibridación a dichas sondas.

En la cuarta aproximación, la expresión de los productos de proteína puede analizarse inmunológicamente, por ejemplo mediante Western blots, inmunoensayos como la radioinmunoprecipitación, inmunoensayos unidos a enzima y similares. El último ensayo del éxito del sistema de expresión, no obstante, involucra la detección de los productos génicos biológicamente activos.

Generación y uso de ABM que poseen un aumento de la función efectora que incluye citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo

En realizaciones preferidas, las glicoformas de ABM quiméricas (por ejemplo, humanizadas) que posee sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo de rata ICR62 y que posee un aumento de la función efectora que incluye citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo están descritas en este documento. La glicosilación de anticuerpos se ha descrito previamente. Véase por ejemplo, Patente Estadounidense N° 6.602.684.

Los ensayos clínicos de anticuerpos monoclonales no conjugados (mAb) para el tratamiento de algunos tipos de cáncer han proporcionado recientemente resultados prometedores. Dillman, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12:223-25 (1997); Deo et al., *Immunology Today* 18:127 (1997). Un IgG1 quimérico, no conjugado ha sido aprobado para el linfoma no Hodgkin de células B folicular o de bajo grado. Dillman, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12:223-25 (1997), mientras que otro mAb no conjugado, un IgG1 humanizado dirigido contra tumores de mama sólidos, también ha mostrado resultados prometedores en ensayos clínicos de fase III. Deo et al., *Immunology Today* 18:127 (1997). Los antígenos de estos dos mAb están altamente expresados en sus correspondientes células tumorales y los anticuerpos median una potente destrucción tumoral mediante células efectoras in vitro e in vivo. Por contra, muchos otros mAb no conjugados con especificidades tumorales finas no desencadenan funciones efectoras de suficiente potencia para ser clínicamente útiles. Frost et al., *Cancer* 80:317-33 (1997); Surfus et al., *J. Immunother.* 19:184-91 (1996). Para algunos de estos mAb más débiles, la terapia conjunta de citoquinas se está analizando en la actualidad. La adición de citoquinas puede estimular la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) mediante el aumento de la actividad y número de linfocitos circulantes. Frost et al., *Cancer* 80:317-33 (1997); Surfus et al., *J. Immunother.* 19:184-91 (1996). CCDA, un ataque lítico sobre las células marcadas con anticuerpo, se desencadena tras la unión de los receptores de leucocitos a la región constante (Fc) de los anticuerpos. Deo et al., *Immunology Today* 18:127 (1997).

Una aproximación diferente, pero complementaria, para aumentar la actividad CCDA de IgG1 no conjugado es modificar la región Fc del anticuerpo. Los estudios de modificación de proteínas han demostrado que los FcγR interaccionan con la región bisagra inferior del dominio IgG CH2. Lund et al., *J. Immunol.* 157:4963-69 (1996). No obstante, la unión a FcγR también requiere la presencia de oligosacáridos covalentemente unidos en la Asn 297 conservada en la región CH2. Lund et al., *J. Immunol.* 157:4963-69 (1996); Wright y Morrison, *Trends Biotech.* 15:26-31 (1997), lo que sugiere que el oligosacárido y el polipéptido directamente contribuyen con el sitio de interacción o que el oligosacárido es necesario para mantener una conformación de polipéptido CH2 activo. La modificación de la estructura de oligosacárido puede por lo tanto explorarse como un medio de aumentar la afinidad de la interacción.

Una molécula de IgG es portadora de oligosacáridos N-unidos en su región Fc, uno en cada cadena pesada. Como cualquier glicoproteína, un anticuerpo se produce como población de glicoformas que comparten la misma estructura de polipéptido pero que posee diferentes oligosacáridos unidos a los sitios de glicosilación. Los oligosacáridos que normalmente se encuentran en la región Fc de IgG en suero son del tipo complejo biantenarico (Wormald et al., *Biochemistry* 36:130-38 (1997), con un nivel bajo de ácido siálico terminal y N-acetilglucosamina bisectada (GlcNAc), y un grado variable de galactosilación terminal y fucosilación central. Algunos estudios sugieren que la estructura de carbohidrato mínima necesaria para la unión de FcγR recae dentro del núcleo del oligosacárido. Lund et al., *J. Immunol.* 157:4963-69 (1996).

Las líneas celulares derivadas de ratón o hámster utilizadas en la industria y academia para la producción terapéutica de mAb no conjugado normalmente se une a los oligosacáridos necesarios determinantes de los sitios Fc. Las IgG expresadas en estas líneas celulares carecen, no obstante, las GlcNAc bisectadas se encuentran en bajas cantidades en las IgG en suero. Lifely et al., *Glycobiology* 318:813-22 (1995). Por contra, se ha observado recientemente que una IgG1 humanizada producida en mieloma de rata, (CAMPATH-1H) es portadora de una

GlcNAc bisectada en algunas de sus glicoformas. Lifely et al., *Glycobiology* 318:813-22 (1995). El anticuerpo derivado de células de rata alcanzó una actividad CCDA in vitro máxima similar a los anticuerpos CAMPATH-1H producidos en las líneas celulares estándar, pero a concentraciones de anticuerpo significativamente inferiores.

- 5 El antígeno CAMPATH está presente normalmente en niveles altos en células de linfoma, y este mAb quimérico posee una actividad CCDA alta en ausencia de una GlcNAc bisectada. Lifely et al., *Glycobiology* 318:813-22 (1995). En la ruta de glicosilación N-unidos, se añade una GlcNAc bisectada mediante GnTIII. Schachter, *Biochem. Cell Biol.* 64:163-81 (1986).
- 10 Estudios previos utilizan una línea celular CHO productora de un solo anticuerpo, que se modificó previamente para expresar, de una forma regulada externamente, diferentes niveles de un gen clonado de una enzima de GnT III (Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999)). Esta aproximación estableció por primera vez una correlación rigurosa entre la expresión de GnTIII y la actividad CCDA del anticuerpo modificado. Así, la invención contempla un anticuerpo quimérico recombinante, o un fragmento del mismo con la especificidad de unión del anticuerpo de rata ICR62, que posee glicosilación alterada resultante del aumento de actividad GnTIII. El aumento de actividad GnTIII resulta en un aumento en el porcentaje de oligosacáridos bisectados, así como un descenso en el porcentaje de residuos de fucosa, en la región Fc de la ABM. Este anticuerpo, o fragmento del mismo, posee un aumento de la afinidad de unión al receptor Fc y aumento de función efectora. Además, la descripción está dirigida a un fragmento de anticuerpo y proteínas de fusión que comprenden una región que es equivalente a la región Fc de inmunoglobulinas. En una realización preferida, el anticuerpo está humanizado.

Aplicaciones terapéuticas de ABM producidos de acuerdo con los métodos de la invención.

- 25 En el sentido más amplio, las ABM descritas en este documento pueden utilizarse células diana in vivo o in vitro que expresan EGFR. Las células que expresan EGFR pueden localizarse con propósitos diagnósticos o terapéuticos. En un aspecto, las ABM de la presente invención pueden utilizarse para detectar la presencia de EGFR en una muestra. En otro aspecto, las ABM descritas en este documento pueden utilizarse para inhibir o reducir la transducción de señales mediadas por EGFR en células que expresan EGFR en la superficie. EGFR está expresado de forma anormal (por ejemplo, sobreexpresado) en muchos tumores humanos en comparación con tejido no tumoral del mismo tipo celular. Así, las ABM descritas en este documento son particularmente útiles en la prevención de la formación de tumores, erradicación de tumores e inhibición de crecimiento tumoral. Mediante el bloqueo de la unión de ligandos de EGFR a EGFR, las ABM descritas en este documento inhiben la activación de células tumorales dependiente de EGF, que incluyen fosforilación de EGFR por tirosina, aumento de la tasa de acidificación extracelular, y proliferación celular. Las ABM descritas en este documento también actúan para parar el ciclo celular, provocando la apoptosis de las células diana (por ejemplo, células tumores), e inhibir la angiogénesis y/o diferenciación de células diana. Las ABM de la invención pueden utilizarse para tratar cualquier tumor que expresa EGFR. Las malignancias particulares que pueden tratarse con las ABM descritas en este documento, no se limitan a, carcinomas de células epidérmicas y escamosas, carcinomas de células no pequeñas de pulmón, gliomas, cáncer de páncreas, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, y carcinoma de células renales.

- 45 Las ABM descritas en este documento pueden utilizarse solas para localizar y matar células tumorales in vivo. Las ABM pueden también utilizarse junto con un agente terapéutico apropiado para tratar el carcinoma humano. Por ejemplo, las ABM pueden utilizarse en combinación con métodos de tratamiento estándar o convencional como la quimioterapia, terapia de radiación o pueden conjugarse o unirse a un fármaco terapéutico, o toxina, así como a una linfoquina o un factor de crecimiento inhibidor de tumores, para la liberación del agente terapéutico con el lugar del carcinoma. Los conjugados de las ABM descritas en este documento que son de vital importancia son (1) inmunotoxinas (conjugados de la ABM y una porción citotóxica) y (2) ABM marcadas (por ejemplo radiomarcaje, marcaje enzimático, o marcaje con fluorocromos) en las que el marcaje proporciona un medio para identificar los inmunocomplejos que incluye la ABM marcada. Las ABM pueden también utilizarse para inducir la lisis a través del proceso de complemento natural, y de interaccionar con las células citotóxicas dependiente de anticuerpo normalmente presente.

- 55 La porción citotóxica de la inmunotoxina puede ser un fármaco citotóxico o una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano o vegetal, o un fragmento enzimáticamente activo ("cadena A ") de dicha toxina. Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas utilizados son la cadena A de la difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina de la difteria, cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de la ricina, cadena A de la abrina, cadena A de la modeccina alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de *diantina*. Proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de *momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicinaa, y neomicina. En otra realización, las ABM están conjugadas con fármacos anticancerígenos de molécula pequeña. Los conjugados de la ABM y dichas porciones citotóxicas están hechas utilizando una serie de agentes de acoplamiento de proteína bifuncional. Ejemplos de dichos reactivos son SPDP, IT, derivados bifuncionales de imidoésteres como adipimidato de dimetilo HCl, ésteres activos como suberato de disuccinimidilo, aldehídos como glutaraldehído, compuestos bis-azido como bis (p-azidobenzóilo) hexanodiamina, derivados de bis-diazonio como bis-(p-diazoniobenzóilo)-etilendiamina, diisocianatos como tolieno 2,6-diisocianato, y compuestos flúor bis-activos como 1,5-difluoro-2,4-

dinitrobenzeno. La porción lisente de una toxina puede unirse al fragmento Fab de las ABM. Toxinas adicionales apropiadas son conocidas en la materia, tal como se evidencia en por ejemplo, Solicitud de Patente Estadounidense publicada N° 2002/0128448

- 5 En una realización, una ABM quimérica (por ejemplo, humanizada), glicomodificada que posee sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo de rata ICR62, está conjugada con la cadena A de ricina. Más ventajosamente, la cadena A de ricina está desglicosilada y se produce mediante métodos recombinantes. Un método ventajoso para producir la inmunotoxina de ricina se describe en Vitetta et al., Science 238, 1098 (1987).
- 10 Cuando se utiliza para matar células cancerígenas humanas in vitro con propósitos de diagnóstico, los conjugados se añadirán normalmente al medio de cultivo celular a una concentración de al menos alrededor de 10 nM. La formulación y forma de administración para la utilización in vitro no son críticas. Se utilizarán normalmente las formulaciones acuosas que son compatibles con el cultivo o medio de perfusión. La citotoxicidad puede interpretarse mediante técnicas convencionales para determinar la presencia o grado de cáncer.
- 15 Como se ha descrito anteriormente, un radiofármaco citotóxico para tratar el cáncer puede realizarse mediante la conjugación de un isótopo radioactivo (por ejemplo, I, Y, Pr) con un ABM quimérico, glicomodificado que posee sustancialmente la misma especificidad de unión del anticuerpo de rata ICR62. El término "porción citotóxica " tal como se utiliza en este documento pretende incluir dichos isótopos.
- 20 En otra realización, los liposomas se rellenan con un fármaco citotóxico y los liposomas se recubren con las ABM de la presente invención. Debido a que existen muchas moléculas de EGFR en la superficie de la célula maligna que expresa EGFR, este método permite la liberación de grandes cantidades de fármaco en el correcto tipo celular.
- 25 Las técnicas para conjugar dichos agentes terapéuticos con anticuerpos son bien conocidos (véase, por ejemplo, Amon et al., "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2ª Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies 84: Biological and Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); y Thorpe et al., "The Reparation and Cytotoxic Properties Of Antibody - Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)).
- 30 Aún otras aplicaciones terapéuticas para las ABM descritas en este documento incluye conjugación o unión, por ejemplo, mediante técnicas de DNA recombinante, con una enzima capaz de convertir un profármaco en un fármaco citotóxico y el uso de ese conjugado anticuerpo-enzima en combinación con el profármaco para convertir el profármaco en un agente citotóxico en el sitio del tumor (véase, por ejemplo, Senter et al., "Anti-Tumor Effects of antibody-alkaline Phosphatase", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4842-46 (1988); "Enhancement of the in vitro and in vivo Antitumor Activities of Fosforylated Mitocycin C and Etoposide Derivatives by Monoclonal Antibody-Alkaline Phosphatase Conjugates", Cancer Research 49:5789-5792 (1989); y Senter, "Activation of Prodrugs by Antibody - Enzyme Conjugates: A New Approach to Cancer Therapy", FASEB J. 4: 188-193 (1990)).
- 35 Aún otros usos terapéuticos para las ABM descritas en este documento involucra el uso, ya sea no conjugado, en presencia del complemento, o como parte de un conjugado anticuerpo-fármaco o anticuerpo-toxina, para eliminar las células tumores de la médula ósea de los pacientes con cáncer. De acuerdo con esta aproximación, la médula ósea autóloga puede purgarse ex vivo mediante el tratamiento con el anticuerpo y la médula se infunde de nuevo en el paciente [véase, por ejemplo, Ramsay et al., "Bone Marrow Purging Using Monoclonal Antibodies", J. Clin. Immunol., 8(2):81-88 (1988)].
- 40 Además, se contempla que la descripción comprende una inmunotoxina de cadena única que comprende dominios de unión a antígeno que permiten sustancialmente la misma especificidad de unión que el anticuerpo de rata ICR62 (por ejemplo, polipéptidos que comprenden el CDR del anticuerpo de rata ICR62) y que comprenden además una toxina polipeptídica. Las inmunotoxinas de cadena única descritas en este documento pueden utilizarse para tratar humano carcinoma in vivo.
- 45 De forma similar, una proteína de fusión que comprende al menos la región de unión a antígeno de una ABM descrita en este documento unida al menos a una porción funcionalmente activa de una segunda proteína que posee actividad antitumoral, por ejemplo, una linfoquina u oncoestatina, pueden utilizarse para tratar carcinoma humano in vivo.
- 50 La descripción describe la reacción del inmunoconjugado (por ejemplo, la inmunotoxina) descrita en este documento en un método para matar selectivamente células tumorales que expresan EGFR. Estas células tumorales pueden ser de un carcinoma humano.
- 55 De forma adicional, esta descripción describe una composición que contiene al menos uno de los inmunoconjugados (por ejemplo, la inmunotoxina) descrita en este documento para utilizar en el tratamiento de carcinomas (por ejemplo, carcinomas humanos) in vivo.
- 60
- 65

En otro aspecto, la descripción está dirigida a una ABM descrita en este documento para utilizar en un método mejorado para tratar trastornos de proliferación celular en el que se expresa el EGFR, particularmente en el que EGFR se expresa de forma anormal (por ejemplo se sobreexpresa), que incluye cáncer de vejiga, cerebro, cabeza y cuello, páncreas, pulmón, mama, ovario, colon, próstata, piel, y riñón. En una realización preferida, la ABM es un anticuerpo anti-EGFR glicomodificado con sustancialmente la misma especificidad de unión que la del anticuerpo de rata ICR62. En otra realización preferida el anticuerpo es humanizado. En otra realización preferida, el anticuerpo humanizado comprende una CDR modificada que comprende sustituciones en cualquier posición excepto aquellas que son necesarias para retener la actividad de unión (por ejemplo, las SDR). Ejemplos de trastornos de proliferación celular que pueden tratarse mediante una ABM de la presente invención incluye, pero no se limita a neoplasmas localizados en: abdomen, hueso, mama, sistema digestivo, hígado, páncreas, peritoneo, glándulas endocrinas (adrenales, paratiroideas, pituitarias, testículos, ovario, timo, tiroides), ojo, cabeza y cuello, sistema nervioso (central y periférico), sistema linfático, pélvico, piel, tejido blando, bazo, región torácica, y sistema urogenital.

De forma similar, otros trastornos de proliferación celular pueden también tratarse mediante las ABM descritas en este documento. Ejemplos de dichos trastornos de proliferación celular incluye, pero no se limitan a: hipergammaglobulinemia, trastornos linfoproliferativos, paraproteinemias, púrpura, sarcoidosis, síndrome de Sezary, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de Gaucher, histiocitosis, y cualquier otra enfermedad de proliferación celular, aparte de neoplasia, localizada en un sistema de órganos de la lista anterior.

De acuerdo con la práctica de esta descripción, el sujeto puede ser un humano, equino, porcino, bovino, murino, canino, felino, y aves. También se incluyen en este documento otros animales de sangre caliente.

La descripción también describe la composición descrita en este documento para utilizar en métodos para inhibir el crecimiento de células tumorales humanas, tratar un tumor en un sujeto, y tratar una enfermedad de tipo proliferativa en un sujeto.

La invención está dirigida también a ABM descritas en este documento para utilizar en métodos para tratar enfermedades no malignas o trastornos en un mamífero que se caracteriza por una activación o producción anormal de EGFR o uno o más ligandos de EGFR. El sujeto generalmente tendrá - células que expresan EGFR, por ejemplo en tejido enfermo del mismo, de forma que las ABM descritas en este documento sean capaces de unirse a células dentro del sujeto.

La activación o expresión anormal de EGFR o un ligando de EGFR puede ocurrir en células del sujeto, por ejemplo en tejido enfermo del sujeto. La activación anormal de EGFR puede atribuirse a la amplificación, sobreexpresión o producción aberrante del EGFR y/o ligando de EGFR. En una realización de la invención, un ensayo diagnóstico o pronóstico se realizará para determinar si la producción o activación anormal de EGFR (o ligando de EGFR) ocurre en el sujeto. Por ejemplo, puede determinarse la amplificación génica y/o sobreexpresión de EGFR y/o ligando. Varios ensayos para determinar dicha amplificación/sobreexpresión está disponible en la materia e incluye los ensayos IHC, FISH y antígeno circulante descritos anteriormente. Alternativamente, o adicionalmente, los niveles de un ligando de EGFR, como TGF- α en o asociado con la muestra puede determinarse de acuerdo con procedimientos conocidos. Dichos ensayos pueden detectar proteína y/o ácido nucleico que lo codifica en la muestra a analizar. En una realización, los niveles de ligando de EGFR en una muestra puede determinarse utilizando inmunohistoquímica (IHC); véase, por ejemplo, Scher et al. Clin. Cancer Research 1:545-550 (1995). Alternativamente, o adicionalmente, se pueden analizar los niveles de EGFR que codifica un ácido nucleico en la muestra a analizar; por ejemplo mediante FISH, southern blotting, o técnicas de PCR.

Además, la sobreexpresión o amplificación de EGFR o ligando de EGFR puede analizarse utilizando un ensayo diagnóstico in vivo, por ejemplo mediante la administración de una molécula (como un anticuerpo) que se une a la molécula a detectar y está marcada con un marcaje detectable (por ejemplo un isótopo radioactivo) y analizando externamente al paciente para localizar el marcaje.

Alternativamente, se pueden detectar heterodímeros de EGFR, especialmente heterodímeros de EGFR-ErbB2, EGFR - ErbB3 o EGFR -ErbB4, en el paciente, por ejemplo en tejido enfermo del mismo, antes de la terapia. Están disponibles varios métodos para detectar las interacciones no covalentes proteína-proteína o de otro tipo para indicar la proximidad entre proteínas de interés. Ejemplos de métodos para la detección de heterodímeros de EGFR incluyen, sin limitación, métodos basados en la inmunofluorescencia, como inmunoprecipitación; transferencia de energía por resonancia de la fluorescencia (FRET) (Selvin, Nat. Struct. Biol. 7:730-34 (2000); Gadella & Jovin, J. Cell Biol. 129:1543-58 (1995); y Nagy et al., Cytometry 32:120-131 (1998)); colocalización de EGFR con ErbB2 o ErbB3 utilizando técnicas de inmunofluorescencia estándar directas o indirectas y microscopía láser de barrido confocal; obtención de imágenes por barrido con láser (LSI) para detectar la unión de anticuerpo y colocalización de EGFR con ErbB2 o ErbB3 en un formato de alto rendimiento, como una placa de micropocillos (Zuck et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:11122-11127 (1999)); o sistema de ensayo eTag/m (Aclara Bio Sciences, Mountain View, Calif.; y solicitud de Patente Estadounidense 2001/0049105, publicada el 6 de diciembre, 2001).

Es evidente, por lo tanto, que la descripción abarca composiciones farmacéuticas, combinaciones y métodos para tratar malignancias humanas como el cáncer de vejiga, cerebro, cabeza y cuello, páncreas, pulmón, mama, ovario, colon, próstata, piel, y riñón. Por ejemplo, la descripción incluye composiciones farmacéuticas para utilizar en el tratamiento de malignancias humanas que comprenden una cantidad farmacéuticamente efectiva de un anticuerpo de la presente invención y un transportador farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones de ABM descritas en este documento pueden administrarse utilizando modos convencionales de administración que incluyen, pero no se limitan a, administración intravenosa, intraperitoneal, oral, intralinfática o directa en el tumor. Es preferible la administración intravenosa.

En un aspecto de la descripción, las formulaciones terapéuticas que contiene las ABM descritas en este documento se preparan para almacenar mediante la mezcla de un anticuerpo que posee el grado deseado de pureza con transportadores opcionales farmacéuticamente aceptables, excipientes o estabilizantes (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Transportadores excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos a los receptores en las dosis y concentraciones utilizadas, e incluye tampones como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butilo o bencilo; parabenos de alquilo como parabeno de metilo o propilo; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de alrededor de 10 residuos); proteínas, como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; azúcares como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraponos formadores de sal como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Las ABM descritas en este documento pueden administrarse a un sujeto para tratar una enfermedad o trastorno que se caracteriza por una actividad anormal de EGFR o ligando de EGFR, como un tumor, ya sea solo o en terapia de combinación con, por ejemplo, un agente quimioterapéutico y/o terapia de radiación. Ejemplos de formulaciones de anticuerpo anti-EGFR están descritos en Herbst y Shen, Cancer 94(5):1593-1611. Los agente quimioterapéuticos adecuados incluye cisplatino, doxorubicina, topotecán, paclitaxel, vinblastina, carboplatino, y etoposido.

Las formulaciones liofilizadas adaptadas para la administración subcutánea están descritas en WO97/04801. Dichas formulaciones liofilizadas pueden reconstituirse con un diluyente adecuado a una alta concentración de proteína y la formulación reconstituida puede administrarse por vía subcutánea al mamífero a tratar.

La formulación de este documento puede también contener más de un compuesto activo que sea necesario para la indicación particular a tratar, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no afectan de forma adversa a la otra. Por ejemplo, es deseable proporcionar además un agente citotóxico, agente quimioterapéutico, citoquina o agente inmunosupresor (por ejemplo uno que actúa sobre las células T, como ciclosporina o un anticuerpo que se une a células T, por ejemplo, uno que se une a LFA-1). La cantidad efectiva de dichos otros agentes depende de la cantidad de antagonista presente en la formulación, el tipo de enfermedad o trastorno o tratamiento, y otros factores descritos anteriormente. Estos se utilizan generalmente en las mismas dosis y con rutas de administración tal como se utiliza en este documento antes o alrededor de 1 a 99% de las dosis empleadas en este documento.

Los ingredientes activos pueden también atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación coloidal de fármacos (por ejemplo: liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas están descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol. A. Ed. (1980).

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluye matrices semipermeables de polímeros sólidos hidrofóbicos que contiene el antagonista, las matrices están en forma de artículos con forma, por ejemplo, capas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluye poliésteres, hidrogeles poliláctidos (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), (Patente Estadounidense N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, acetato de etilen-vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico - ácido glicólico como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico - ácido glicólico y acetato de leuprolido), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones a utilizar para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles.

Las composiciones descritas en este documento pueden estar en una serie de formas de dosificación que incluye,

pero no se limita a, soluciones o suspensiones líquidas, comprimidos, píldoras, polvos, supositorios, microcápsulas o microvesículas poliméricas, liposomas, y soluciones inyectables o infundibles. La forma preferible depende del modo de administración y la aplicación terapéutica.

5 Las composiciones descritas en este documento también preferiblemente incluyen transportadores y adyuvantes convencionales farmacéuticamente aceptables conocidos en la materia como albúmina de suero humano, intercambiadores de iones, alúmina, lecitina, sustancias tamponantes como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, y sales o electrolitos como sulfato de protamina.

10 El modo más efectivo de administración y régimen de dosificación de las composiciones farmacéuticas como se ha descrito en este documento depende de la gravedad y curso de la enfermedad, de la salud del paciente y de la respuesta al tratamiento y el juicio del médico que atiende. De acuerdo con esto, las dosificaciones de las composiciones deberán calcularse para el paciente individual. Sin embargo, una dosis efectiva de las composiciones de esta invención estará generalmente en el rango de alrededor de 0,01 a alrededor de 2000 mg/kg. En una
15 realización, la dosis efectiva está en el rango de alrededor de 1,0 mg/kg a alrededor de 15,0 mg/kg. En una realización más específica, la dosis está en el rango de alrededor de 1,5 mg/kg a alrededor de 12 mg/kg. En otras realizaciones, la dosis está en el rango de alrededor de 1,5 mg/kg a alrededor de 4,5 mg/kg, o de alrededor de 4,5 mg/kg a alrededor de 12 mg/kg. La dosis tal como se utiliza en este documento puede también ser cualquier dosis dentro de estos rangos, que incluyen, pero no se limitan a, 1,0 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3,0 mg/kg,
20 3,5 mg/kg, 4,0 mg/kg, 4,5 mg/kg, 5,0 mg/kg, 5,5 mg/kg, 6,0 mg/kg, 6,5 mg/kg, 7,0 mg/kg, 7,5 mg/kg, 8,0 mg/kg, 8,5 mg/kg, 9,0 mg/kg, 9,5 mg/kg, 10,0 mg/kg, 10,5 mg/kg, 11,0 mg/kg, 11,5 mg/kg, 12,0 mg/kg, 12,5 mg/kg, 13,0 mg/kg, 13,5 mg/kg, 14,0 mg/kg, 14,5 mg/kg, o 15,0 mg/kg.

25 Las moléculas descritas en este documento pueden estar en una serie de formas de dosificación que incluye, pero no se limita a, soluciones o suspensiones líquidas, comprimidos, píldoras, polvos, supositorios, microcápsulas o microvesículas poliméricas, liposomas, y soluciones inyectables o infundibles. La forma preferible depende del modo de administración y la aplicación terapéutica.

30 Las dosis descritas en este documento pueden determinarse en algunos casos, mediante el uso de biomarcadores predictivos. Los biomarcadores predictivos son marcadores moleculares que se utilizan para determinar (es decir, observar y/o cuantificar) un patrón de expresión y/o activación de genes o proteínas relacionadas con el tumor, o componentes celulares de una ruta de señalización relacionada con el tumor. Descubrir los efectos biológicos de las terapias dirigidas en los tejidos tumorales y correlacionar estos efectos con la respuesta clínica ayuda a identificar el crecimiento predominante y rutas de supervivencia operativas en tumores, con lo que se establece un perfil de
35 respondedores probables y a la inversa proporcionando una forma para diseñar estrategias para superar la resistencia. Por ejemplo, los biomarcadores para la terapia anti-EGFR puede comprender moléculas que están en la ruta de señalización de EGFR corriente abajo que conduce a un trastorno de proliferación celular que incluye, pero no se limitan a, Akt, RAS, RAF, MAPK, ERK1, ERK2, PKC, STAT3, STAT5 (Mitchell, Nature Biotech. 22: 363-364 (2004); Becker, Nature Biotech 22: 15-18 (2004); Tsao y Herbst, Signal 4:4-9 (2003)). Los biomarcadores para la
40 terapia anti-EGFR puede también comprender receptores del factor de crecimiento como EGFR, ErbB-2 (HER2/neu), y ErbB-3 (HER3), y pueden ser predictivos positivos o negativos de respuesta del paciente a terapia anti-EGFR. Por ejemplo, se determinó que el receptor del factor de crecimiento ErbB-3 (HER3) era un biomarcador predictivo negativo para el anticuerpo anti-EGFR ABX-EGF (Sol. de Pub. de Pat. Estadounidense N° 2004/0132097 A1).

45 Los biomarcadores predictivos pueden medirse mediante ensayos celulares que son bien conocidos en la materia que incluyen, pero no se limitan a inmunohistoquímica, citometría de flujo, inmunofluorescencia, ensayos de captura y detección, y ensayos de fase reversa, y/o ensayos descritos en la Sol. de Pub. de Pat. Estadounidense N° 2004/0132097 A1. Los biomarcadores predictivos de terapia anti-EGFR, por sí solos, pueden identificarse de acuerdo
50 con las técnicas descritas en la Sol. de Pub. de Pat. Estadounidense N° 2003/0190689 A1.

En un aspecto, la descripción describe una composición que comprende una ABM descrita en este documento para utilizar en un método para tratar un trastorno relacionado con EGFR en un sujeto humano que se cree que responderá positivamente a un tratamiento anti-EGFR que comprende predecir una respuesta a una terapia anti-
55 EGFR en un sujeto humano que necesita el tratamiento mediante el análisis de una muestra de un sujeto humano antes de la terapia con uno o una serie de reactivos que detectan la expresión y/o activación de biomarcadores predictivos para un trastorno relacionado con EGFR como el cáncer; determinando un patrón de expresión y/o activación de uno o más de los biomarcadores predictivos, en el que el patrón predice la respuesta de un sujeto humano a la terapia anti-EGFR. Tal como se utiliza en este documento, un sujeto humano que se predice que
60 responderá positivamente a un tratamiento anti-EGFR es uno para los que anti-EGFR tendrá un efecto medible sobre el trastorno relacionado con EGFR- (por ejemplo, regresión / encogimiento del tumor) y para el que los beneficios de la terapia anti-EGFR no está sobrepasado por los efectos adversos (por ejemplo, toxicidad). Tal como se utiliza en este documento, una muestra significa cualquier muestra biológica de un organismo, particularmente un humano, que comprende una o más células, que incluye células únicas de cualquier origen, muestras de tejido o
65 biopsia que han sido eliminadas de los órganos como mama, pulmón, tracto gastrointestinal, piel, cérvix, ovario, próstata, riñón, cerebro, cabeza y cuello, o cualquier otro órgano o tejido del cuerpo, y otras muestras corporales que

incluyen, pero no se limitan a, frotis, esputo, secreciones, líquido cefalorraquídeo, bilis, sangre, líquido linfático, orina y heces.

La composición que comprende una ABM descrita en este documento se formulará, dosificará, y administrará de una manera consistente con las buenas prácticas médicas. Los factores para consideración en este contexto incluyen la enfermedad o trastorno particular a tratar, el mamífero particular a tratar, la condición clínica del paciente, la causa de la enfermedad o trastorno, el lugar de liberación del agente, el método de administración, la pauta de administración, y otros factores conocidos por los médicos practicantes. La cantidad terapéuticamente efectiva del antagonista a administrar estará regido por estas consideraciones.

Como proposición general, la cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo administrado parenteralmente por cada dosis estará en el rango de alrededor de 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal del paciente por día, con el rango inicial típico de antagonista utilizado en el rango de alrededor de 2 a 10 mg/kg. En una realización, la cantidad terapéuticamente efectiva está en el rango desde alrededor de 1,0 mg/kg a alrededor de 15,0 mg/kg. En una realización más específica, la dosis está en el rango desde alrededor de 1,5 mg/kg a alrededor de 12 mg/kg. En otras realizaciones, la dosis está en el rango desde alrededor de 1,5 mg/kg a alrededor de 4,5 mg/kg, o desde alrededor de 4,5 mg/kg a alrededor de 12 mg/kg. La dosis de la presente invención puede también ser cualquier dosis dentro de estos rangos, que incluyen, pero no se limitan a, 1,0 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3,0 mg/kg, 3,5 mg/kg, 4,0 mg/kg, 4,5 mg/kg, 5,0 mg/kg, 5,5 mg/kg, 6,0 mg/kg, 6,5 mg/kg, 7,0 mg/kg, 7,5 mg/kg, 8,0 mg/kg, 8,5 mg/kg, 9,0 mg/kg, 9,5 mg/kg, 10,0 mg/kg, 10,5 mg/kg, 11,0 mg/kg, 11,5 mg/kg, 12,0 mg/kg, 12,5 mg/kg, 13,0 mg/kg, 13,5 mg/kg, 14,0 mg/kg, 14,5 mg/kg, o 15,0 mg/kg.

En una realización preferida, la ABM es un anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo humanizado. Las dosificaciones adecuadas para dicho anticuerpo no conjugado están, por ejemplo, en el rango desde alrededor de 20 mg/m² a alrededor de 1000 mg/m². Por ejemplo, uno puede administrar al paciente una o más dosis de sustancialmente menos de 375 mg/m² de anticuerpo, por ejemplo, en el que la dosis está en el rango desde alrededor de 20 mg/m² a alrededor de 250 mg/m², por ejemplo desde alrededor de 50 mg/m² a alrededor de 200 mg/m².

Además, uno puede administrar una o más dosis iniciales del anticuerpo seguido de uno o más dosis posteriores, en el que la dosis mg/m² del anticuerpo en las dosis posteriores excede la dosis mg/m² del anticuerpo en la dosis inicial. Por ejemplo, la dosis inicial puede estar en el rango desde alrededor de 20 mg/m² a alrededor de 250 mg/m² (por ejemplo, desde alrededor de 50 mg/m² a alrededor de 200 mg/m²) y la posterior dosis puede estar en el rango desde alrededor de 250 mg/m² a alrededor de 1000 mg/m².

Tal como se ha dicho antes, no obstante, estas cantidades sugeridas de ABM están sujetas a una gran cantidad de agentes terapéuticos. El factor clave en la selección de una dosis y pauta apropiada es el resultado obtenido, como se ha indicado antes. Por ejemplo, las dosis relativamente altas pueden ser necesarias inicialmente para el tratamiento de enfermedades agudas y en curso. Para obtener los resultados más eficaces, dependiendo de la enfermedad o trastorno, el antagonista se administra tan pronto aparezca el primer signo, diagnóstico, aparición, u ocurrencia de la enfermedad o trastorno como sea posible o durante las remisiones de la enfermedad o trastorno.

En el caso de anticuerpos anti-EGFR utilizados para tratar tumores, los resultados terapéuticos óptimos se logran generalmente con una dosis que es suficiente para saturar completamente los receptores de EGF sobre las células diana. La dosis necesaria para lograr la saturación dependerá del número de receptores EGF expresados por célula tumoral (que pueden variar significativamente entre diferentes tipos de tumores). Las concentraciones de suero tan bajas como 30 nM han sido efectivas en el tratamiento de algunos tumores, mientras que la concentración anterior 100 nM puede ser necesaria para lograr el efecto terapéutico óptimo con otros tumores. La dosis necesaria para lograr la saturación de un tumor determinado puede determinarse fácilmente in vitro mediante radioinmunoensayo o inmunoprecipitación.

En general, para la terapia de combinación con radiación, un régimen terapéutico adecuado implica ocho infusiones semanales de una ABM anti-EGFR descrita en este documento en una dosis de carga de 100-500 mg/m² seguido por dosis de mantenimiento de 100-250 mg/m² y radiación en la cantidad de 70,0 Gy en una dosis diaria de 2,0 Gy. Para la terapia de combinación con quimioterapia, un régimen terapéutico adecuado implica la administración de una ABM anti-EGFR descrita en este documento con una dosis de carga/ mantenimiento semanal de 100/100 mg/m², 400/250 mg/m², o 500/250 mg/m² en combinación con cisplatino en una dosis de 100 mg/m² cada tres semanas. Alternativamente, pueden utilizarse gemcitabina o irinotecan en lugar de cisplatino.

Las ABM descritas en este documento deben administrarse mediante cualquier medio adecuado, que incluye administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar, e intranasal, y si se desea para el tratamiento inmunosupresor local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluye administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. Además, el antagonista puede administrarse adecuadamente mediante infusión pulsada, por ejemplo, con dosis decrecientes del antagonista. Preferiblemente la dosificación se realiza mediante inyecciones, más preferiblemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es corta o crónica.

Se pueden administrar otros compuestos, como agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, agentes inmunosupresores y/o citoquinas con los antagonistas de este documento. La administración combinada incluye coadministración, utilizando formulaciones separadas o una formulación farmacéutica única, y administración consecutiva en cualquier orden, en el que preferiblemente existe un periodo de tiempo en el que ambos (o todos) los agentes activos simultáneamente ejercen su actividad biológica.

Quedará claro que la dosis necesaria de la composición descrita en este documento para lograr curas puede reducirse aún más con una optimización de la pauta.

De acuerdo con la práctica de la descripción, el transportador farmacéutico puede ser un transportador lipídico. El transportador lipídico puede ser un fosfolípido. Además, el transportador lipídico puede ser un ácido graso. También, el transportador lipídico puede ser un detergente. Tal como se utiliza en este documento, un detergente es cualquier sustancia que altera la tensión superficial de un líquido, generalmente disminuyéndolo.

En un ejemplo de la descripción, el detergente puede ser un detergente no iónico. Ejemplos de detergente no iónicos incluye, pero no se limita a, polisorbato 80 (también conocido como Tween 80 o (monooleato de polioxietilenesorbitan), Brij, y Triton (por ejemplo Triton WR-1339 y Triton A-20).

Alternativamente, el detergente puede ser un detergente iónico. Un ejemplo de un detergente iónico incluye, pero no se limita a, bromuro de alquiltrimetilamonio.

Adicionalmente, de acuerdo con la invención, el transportador lipídico puede ser un liposoma. Tal como se utiliza en esta solicitud, un "liposoma" es cualquier vesícula unida a una membrana que contiene cualquier molécula de la invención o combinaciones de las mismas.

En aún otra realización, la descripción está relacionada con una ABM como se ha descrito en este documento para utilizar como medicamento, en particular para utilizar en el tratamiento o profilaxis del cáncer o para utilizar en una condición o lesión precancerosa. El cáncer puede ser, por ejemplo, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCL), cáncer de pulmón de células bronquioalveolares, cáncer de huesos, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de útero, carcinoma de las trompas de falopio, carcinoma de endometrio, carcinoma de cérvix, carcinoma de vagina, carcinoma de vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer de sistema endocrino, cáncer de glándula tiroides, cáncer de glándula paratiroides, cáncer de glándula adrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, mesotelioma, cáncer hepatocelular, cáncer biliar, leucemia crónica o aguda, linfoma linfocítico, neoplasia del sistema nervioso central (SNC), tumores del eje espinal, glioma de cerebro, glioblastoma multiforme, astrocitomas, schwannomas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, carcinoma de células escamosas, adenoma pituitario, que incluyen versiones refractarias de cualquiera de los cánceres anteriores, o una combinación de uno o más de los cánceres anteriores. La condición o lesión precancerosa incluye, por ejemplo, el grupo que consiste en leucoplaquia oral, queratosis actínica (queratosis solar), pólipos precancerosos del colon o recto, displasia del epitelio gástrico, displasia adenomatosa, síndrome de cáncer no poliposo hereditario (HNPCC), esófago de Barrett, displasia de vejiga, y condiciones cervicales precancerosas.

Preferiblemente, dicho cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de riñón, y cáncer de cerebro.

Aún otra realización es el uso de la ABM como se ha descrito en este documento para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis del cáncer. El cáncer es como se ha definido anteriormente.

Preferiblemente, dicho cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de riñón, y cáncer de cerebro.

También preferiblemente, dicha molécula de unión a antígeno se utiliza en una cantidad terapéuticamente efectiva desde alrededor de 1,0 mg/kg a alrededor de 15 mg/kg.

También más preferiblemente, dicha molécula de unión a antígeno se utiliza en una cantidad terapéuticamente efectiva desde alrededor de 1,5 mg/kg a alrededor de 12 mg/kg.

También más preferiblemente, dicha molécula de unión a antígeno se utiliza en una cantidad terapéuticamente efectiva desde alrededor de 1,5 mg/kg a alrededor de 4,5 mg/kg.

También más preferiblemente, dicha molécula de unión a antígeno se utiliza en una cantidad terapéuticamente efectiva desde alrededor de 4,5 mg/kg a alrededor de 12 mg/kg.

5 Más preferiblemente, dicha molécula de unión a antígeno se utiliza en una cantidad terapéuticamente efectiva de alrededor de 1,5 mg/kg.

También más preferiblemente, dicha molécula de unión a antígeno se utiliza en una cantidad terapéuticamente efectiva de alrededor de 4,5 mg/kg.

10 También más preferiblemente, dicha molécula de unión a antígeno se utiliza en una cantidad terapéuticamente efectiva de alrededor de 1,2 mg/kg.

15 En otra realización, la descripción está dirigida a un método de tratamiento de un trastorno relacionado con EGFR en un mamífero que necesita de este tratamiento que comprende la administración al mamífero de una ABM de la presente invención, en el que el tratamiento resulta en concentraciones de suero de dicha ABM entre alrededor de 1 y alrededor de 500 µg/ml, durante un periodo de al menos 4 semanas, y en el que el tratamiento no provoca un nivel de toxicidad clínicamente significativo en dicho mamífero. En otras realizaciones, la concentración en suero está en la cantidad seleccionada de entre el grupo que consiste en alrededor de 1 µg/ml, alrededor de 25 µg/ml, alrededor de 50 µg/ml, alrededor de 100 µg/ml, alrededor de 200 µg/ml, alrededor de 300 µg/ml, alrededor de 400 µg/ml, 20 alrededor de 500 µg/ml, entre alrededor de 1 y alrededor de 100 µg/ml, entre alrededor de 1 y alrededor de 200 µg/ml, entre alrededor de 1 y alrededor de 300 µg/ml, entre alrededor de 1 y alrededor de 400 µg/ml, y entre alrededor de 1 y alrededor de 500 µg/ml. En una realización preferida, el mamífero es un humano. En una realización la ABM es un anticuerpo. En una realización preferida, el anticuerpo está glicosmodificado y posee un aumento de la unión de FcγRIII en comparación con una forma no glicosmodificada del anticuerpo.

25 En un aspecto, la descripción está dirigida a una molécula de unión a antígeno (ABM) que se une específicamente a EGFR, en el que la ABM comprende además una región Fc de inmunoglobulina o fragmento de la misma, y en el que la región Fc o fragmento de la misma ha sido glicosmodificado para tener un aumento de la función efectora en comparación con una forma no glicosmodificada. En una realización particular, la función efectora es un aumento de la citotoxicidad celular mediada por Fc.

30 En otro aspecto, la descripción está dirigida a ABM que se une específicamente a EGFR, en el que la ABM comprende además una región Fc de inmunoglobulina o fragmento de la misma, y en el que la región Fc o fragmento de la misma ha sido glicosmodificada para tener un aumento de la afinidad de unión al receptor Fc en comparación con una forma no glicosmodificada.

35 En otro aspecto, la descripción está dirigida a una ABM que se une específicamente a EGFR, en el que la ABM no provoca un nivel clínicamente significativo de toxicidad cuando se administra a un sujeto en una cantidad terapéuticamente efectiva. En una realización, la ABM comprende además una región Fc de inmunoglobulina o fragmento de la misma. En una realización específica, la región Fc o fragmento de la misma ha sido modificada para tener un aumento de la función efectora en comparación con una forma no modificada. En una realización más específica, la función efectora es un aumento de la citotoxicidad celular mediada por Fc. En otra realización, la región Fc o fragmento de la misma ha sido modificada para tener un aumento de la afinidad de unión al receptor Fc en comparación con una forma no modificada. En una realización específica, la cantidad terapéuticamente efectiva es desde alrededor de 1,0 mg/kg a alrededor de 15 mg/kg. En otra realización específica, la cantidad terapéuticamente efectiva es una concentración en suero de alrededor de un microgramo por mililitro.

40 En otro aspecto, la descripción está dirigida a una ABM como se ha descrito anteriormente para utilizar en el tratamiento de un trastorno relacionado con EGFR en un sujeto que necesita dicho tratamiento. En otro aspecto, la descripción está dirigida a una ABM que se une específicamente a EGFR para utilizar en el tratamiento de un trastorno relacionado con EGFR en un sujeto mamífero que necesita dicho tratamiento, en el que la ABM no provoca un nivel clínicamente significativo de toxicidad cuando se administra a un sujeto mamífero en una cantidad terapéuticamente efectiva. En una realización, la cantidad terapéuticamente efectiva proporciona concentraciones de suero de la ABM de entre alrededor 1 y alrededor de 100 microgramos por mililitro durante un periodo de al menos 4 45 semanas. En otra realización, la ABM utilizada en el tratamiento comprende además una región Fc de inmunoglobulina o fragmento de la misma. En una realización más específica, la región Fc o fragmento de la misma ha sido modificada para tener un aumento de la función efectora en comparación con una forma no modificada. En una realización particular, la función efectora es un aumento de la citotoxicidad celular mediada por Fc. En otra realización particular, la región Fc o fragmento de la misma ha sido modificada para tener un aumento de la afinidad de unión al receptor Fc en comparación con una forma no modificada. En una realización preferida, el receptor Fc es FcγRIII.

Artículos de manufactura

65 En otra realización descrita en este documento, se proporciona un artículo de manufactura que contiene materiales

útiles para el tratamiento de trastornos descritos anteriormente. El artículo de manufactura comprende un contenedor y una etiqueta o prospecto asociado al contenedor. Los contenedores adecuados incluye, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los contenedores pueden estar formados de una serie de materiales como vidrio o plástico. El contenedor mantiene una composición que es efectiva para tratar la condición y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que posee un tope perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo anti-EGFR. La etiqueta o prospecto indica que la composición se utiliza para tratar la condición de elección, como una enfermedad o trastorno no maligno, en el que la enfermedad o trastorno implica activación o producción anormal de un receptor de EGFR y/o un ligando de EGFR, por ejemplo una enfermedad o trastorno hiperproliferativo benigno. Además, el artículo de manufactura puede comprender (a) un primer contenedor con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un primer anticuerpo que se une a EGFR e inhibe el crecimiento de las células que sobreexpresan EGFR; y (b) un segundo contenedor con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un segundo anticuerpo que se une a EGFR y bloquea la activación de ligando de un receptor de EGFR. El artículo de manufactura en esta realización de la invención puede comprender además un prospecto que indica que las composiciones del primer y segundo anticuerpo pueden utilizarse para tratar una enfermedad o trastorno no maligno del listado de dichas enfermedades o trastornos en la sección de definiciones anterior. Además, el prospecto puede instruir al usuario de la composición (que comprende un anticuerpo que se une a EGFR y bloquea la activación de ligando de un receptor de EGFR) para combinar con la terapia del anticuerpo y cualquiera de las terapias adjuntas descritas en la sección precedente (por ejemplo un agente quimioterapéutico, un fármaco dirigido contra EGFR, un agente antiangiogénico, un agente inmunosupresor, un inhibidor de la tirosina quinasa, un compuesto anti-hormonal, un cardioprotector y/o una citoquina). Alternativamente, o adicionalmente, el artículo de manufactura puede comprender además un segundo (o tercer) contenedor que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, como agua bacteriostática para inyección (BWF1), tampón fosfato salino, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede también incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluye otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, y jeringas.

Los siguientes ejemplos explican la invención en más detalle. Las siguientes preparaciones y ejemplos se proporcionan para permitir a los expertos en la materia entender más claramente y poner en práctica la invención.

EJEMPLOS

A no ser que se especifique de otra manera, las referencias a la numeración de posiciones específicas de residuos de aminoácido en los siguientes Ejemplos están de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

Ejemplo 1

Materiales y Métodos

Aproximación del aceptor de elevada homología

La búsqueda del marco de un anticuerpo aceptor de elevada homología se realizó alineando la secuencia de la proteína ICR62 de rata con una colección de secuencias de línea germinal humana y escogiendo la secuencia humana que muestra una mayor identidad de secuencia, conservando todos los residuos canónicos a nivel funcional. En este punto, la secuencia 1-e de la familia VH1 de la base de datos VBase se escogió como secuencia marco aceptora de la cadena pesada, y la secuencia A30 de la familia VK1 de la base de datos VBase se escogió como marco aceptor de la cadena ligera. En estos dos marcos aceptores, se injertaron las tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) y/o los residuos determinantes de la especificidad de esos CDR de los dominios variables pesados y ligeros de la ICR62 de rata. Como la región 4 marco no forma parte de la región variable del gen en línea germinal, el alineamiento for esa posición se realizó de forma individual. La región JH6 se escogió como cadena pesada, y la región JK2 se escogió como cadena ligera. El modelado molecular del dominio de inmunoglobulina diseñado reveló una posición fuera del CDR1 de Kabat que potencialmente requería los residuos de aminoácido murinos en lugar de los humanos fuera del CDR. La reintroducción de residuos de aminoácido murinos en el marco humano generaría las denominadas "retromutaciones". Por ejemplo, el residuo de aminoácido del aceptor humano en la posición 27 de Kabat (Glicina en 1-e) se retromutó a un residuo de tirosina. Para mostrar la importancia de los residuos de unión a antígeno, se diseñaron variantes de anticuerpo humanizado que incluían u omitían las retromutaciones. La cadena ligera del anticuerpo humanizado no requirió ninguna retromutación. Tras diseñar las de secuencias de proteína, las secuencias de DNA que codifican estas proteínas se sintetizaron como se detalla a continuación.

Aproximación de mezcla de marcos

Para evitar la necesidad de introducir retromutaciones en posiciones críticas (críticas para mantener una buena afinidad de unión al antígeno o las funciones del anticuerpo) del marco del aceptor humano, se investigó si la región marco 1 (FR1), las regiones marco 1 (FR1) y 2 (FR2) juntas, o la región marco 3 (FR3) de un anticuerpo funcionalmente humanizado podía reemplazarse con secuencias de anticuerpo humano que ya poseen residuos del

donante, o residuos de aminoácido que son funcionalmente equivalentes a los residuos del donante, en posiciones de residuo importantes en la secuencia natural de línea germinal humana. Con este propósito, las regiones marco 1, 2 y 3 de VH de la secuencia VH de ICR62 de rata se alinearon individualmente con las secuencias de línea germinal humana. Aquí no se utilice la mayor identidad de secuencia para escoger los marcos del aceptor; sino que se realizó un emparejamiento de varios residuos críticos. Estos residuos críticos comprenden los denominados residuos canónicos, y también aquellos residuos en la posición 27, 28 y 30 (numeración de Kabat), que están fuera de la definición de la CDR1 de Kabat, pero que a menudo están involucrados en la unión de antígeno. Además, los residuos críticos son aquellos que muestran una importante interacción con las CDR, lo que puede determinarse utilizando el modelado molecular. Las secuencias IMGT IGHV1-58 (N° registro M29809), IGHV5-51 (N° registro M99686), así como la secuencia de VBase 1-02 de la familia VH1 se escogieron como las adecuadas para reemplazar la FR1, 2 o 3. Brevemente: la IGHV1-58 mostró un patrón prometedor en las posiciones de Kabat de 27 a 30, pero no cumplió los criterios para la posición canónica 71. La IGHV5-51 poseía un residuo 71 emparejado, de forma que su FR3 podía utilizarse. También su FR1 es cercana a la secuencia FR1 deseada.

La 1-e de VH1 cumplió todos los criterios aparte de la posición 27. La secuencia 1-02 se consideró aceptable para las regiones FR1 y FR2, pero requeriría una retromutación en FR3.

Tras diseñar las secuencias de proteína, se sintetizaron las secuencias de DNA que codifican estas proteínas como se detalla a continuación. Utilizando esta aproximación no eran necesarias las retromutaciones en la mayoría de las construcciones de la cadena pesada, para mantener buenos niveles de unión del antígeno. La cronología y los razonamientos de las construcciones de los marcos mixtos se explican en la sección de resultados.

Síntesis del gen del anticuerpo

Tras haber diseñado la secuencia de aminoácidos de la región V del anticuerpo humanizado, se generó la secuencia de DNA. Los datos de la secuencia de DNA de las regiones marco individuales se encontró en las bases de datos (por ejemplo IMGT o VBase) de secuencias de línea germinal humana. La información de la secuencia de DNA de las regiones CDR se tomó de la secuencia publicada del anticuerpo ICR62 de rata (véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 95/20045). Con estas secuencias, la secuencia de DNA completa se ensambló virtualmente. Con los datos de esta secuencia de DNA, se introdujeron dianas de restricción diagnósticas en la secuencia virtual introduciendo mutaciones silentes, creando dianas de reconocimiento para las endonucleasas de restricción. Para obtener la cadena de DNA física, se realizó la síntesis génica (véase por ejemplo, Wheeler et al. 1995). En este método, se diseñaron los oligonucleótidos a partir de los genes de interés, de forma que una serie de oligonucleótidos se deriva de la cadena codificante, y la otra serie es de la cadena no codificante. Los extremos 3' y 5' de cada oligonucleótido (excepto el primero y el último de la fila) siempre muestran secuencias complementarias a los dos cebadores derivados de la cadena opuesta. Cuando se añaden estos oligonucleótidos en un tampón de reacción adecuado para una polimerasa estable al calor, y se añade Mg²⁺, dNTP y una polimerasa de DNA, cada oligonucleótido se extiende desde su extremo 3'. El extremo 3' acabado de formar de un cebador entonces hibrida con el siguiente cebador de la cadena opuesta, y se extiende de nuevo su secuencia bajo condiciones adecuadas para la elongación de la cadena de DNA dependiente de molde. El producto final se clonó en un vector convencional para la propagación en *E. coli*.

Producción de anticuerpo

Para la construcción de los vectores de expresión de la cadena ligera y pesada de anti-EGFR quiméricos (es decir, región V completamente de rata y región C humana) y humanizados, se añadieron secuencias líder (de secreción) de la cadena pesada y ligera humana corriente arriba de las secuencias de DNA de la región variable. Río abajo de las regiones variables, se añadieron las regiones constantes de la IgG1 para la cadena pesada, y la región constante kappa de la cadena ligera utilizando técnicas estándar de biología molecular. Las secuencias de DNA de la cadena pesada y ligera del anticuerpo completo resultante se subclonaron en vectores de expresión de mamíferos (uno para la cadena ligera y uno para la cadena pesada) bajo el control del promotor MPSV y río arriba de un lugar de polyA sintético, y cada vector era portador de una secuencia OriP del EBV.

Los anticuerpos se obtuvieron por cotransfección de las células HEK293-EBNA con los vectores de expresión de la cadena pesada y ligera del anticuerpo de mamífero utilizando una estrategia de transfección con fosfato cálcico. Las células HEK293-EBNA en crecimiento exponencial se transfectaron mediante el método del fosfato cálcico. Para la producción de anticuerpo no modificado, las células se transfectaron sólo con los vectores de expresión de la cadena pesada y ligera del anticuerpo en una proporción 1:1. Para la producción del anticuerpo glicosilado, las células se cotransfectaron con cuatro plásmidos, dos para la expresión del anticuerpo, uno para la expresión de un polipéptido de fusión de GnTIII, y uno para la expresión de manosidasa II a una proporción 4:4:1:1, respectivamente. Las células se sembraron como cultivos en monocapa adherente en recipientes T utilizando medio de cultivo DMEM suplementado con FCS al 10%, y se transfectaron cuando estaban en un confluente entre el 50 y 80%. Para la transfección de un recipiente T75, se sembraron 8 millones de células 24 horas antes de la transfección en 14 ml de medio de cultivo DMEM suplementado con FCS (al 10% V/V final) y neomicina 250 µg/ml, y las células se situaron a 37°C en un incubador con una atmósfera de CO₂ al 5% durante toda la noche. Para cada recipiente T75 a transfectar, se preparó una solución de DNA, CaCl₂ y agua mezclando 47 µg totales de DNA del vector plasmídico

- dividido a partes iguales entre los vectores de expresión de la cadena ligera y la pesada, 235 μ l de una solución 1M de CaCl_2 , y añadiendo agua hasta un volumen final de 469 μ l. A esta solución se añadieron 469 ml de una solución de HEPES 50mM, NaCl 280 mM, Na_2HPO_4 1,5 mM a pH 7,05, se mezcló inmediatamente durante 10 s. y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 s. La suspensión se diluyó con 12 ml de DMEM suplementado con al
- 5 FCS 2%, y se añadió al T75 en lugar del medio existente. Las células se incubaron a 37°C, con CO_2 al 5% durante alrededor de 17 a 20 horas, luego el medio se reemplazó con 12 ml de DMEM, FCS al 10%. El medio de cultivo acondicionado se recogió entre 5 y 7 días post-transfección, se centrifugó durante 5 min. a 1200 rpm, seguido de una segunda centrifugación durante 10 min. a 4000 rpm y se mantuvo a 4°C.
- 10 Los anticuerpos secretados se purificaron mediante una cromatografía de afinidad de proteína A, seguido de una cromatografía de intercambio de cationes y un paso final de cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Superdex 200 (Amersham Pharmacia) intercambiando el tampón por salina tamponada con fosfato y recogiendo los anticuerpos IgG1 monoméricos puros. La concentración de anticuerpo se estimó utilizando un espectrofotómetro a partir de la absorbancia a 280 nm. Los anticuerpos se formularon en una solución de fosfato potásico 25 mM, cloruro
- 15 sódico 125 mM, glicina 100 mM, a pH 6.7.
- Las variantes glicomodificadas del anticuerpo humanizado se produjeron por cotransfección de los vectores de expresión de anticuerpo junto con un vector de expresión de la glucosiltransferasa GnT-III, o junto con un vector de expresión GnT-III más un vector de expresión de la manosidasa II de Golgi. Los anticuerpos glicomodificados se
- 20 purificaron y se formularon como se ha descrito anteriormente para los anticuerpos no glicomodificados. Los oligosacáridos unidos a la región Fc de los anticuerpos se analizaron mediante EM-MALDI/TOF como se describe a continuación.
- 25 **Análisis de los oligosacáridos**
- Los oligosacáridos se liberaron enzimáticamente de los anticuerpos mediante digestión con PNGaseF, estando los anticuerpos inmovilizados sobre una membrana de PVDF o en solución.
- 30 La solución de digestión resultante que contiene los oligosacáridos liberados se prepararon directamente para su análisis MALDI/TOF-MS o se digirieron posteriormente con glucosidasa EndoH previamente a su preparación como muestra para su análisis EM-MALDI/TOF.
- Método de liberación de oligosacáridos para anticuerpos inmovilizados en una membrana de PVDF**
- 35 Los pocillos de una placa de 96 pocillos hechos con una membrana de PVDF (Immobilon P, Millipore, Bedford, Massachusetts) se humectaron con 100 ml de metanol y el líquido se hizo pasar a través de la membrana de PVDF utilizando vacío aplicado al colector de vacío Multiscreen (Millipore, Bedford, Massachusetts). Las membranas de PVDF se lavaron tres veces con 300 ml de agua. Entonces se lavaron los pocillos con 50 ml de tampón RCM (Urea 8 M, Tris 360 mM, EDTA 3,2 mM, pH 8,6). Se aplicaron entre 30-40 mg de anticuerpo en un pocillo que contiene 10
- 40 ml de tampón RCM. El líquido en el pocillo se hizo pasar a través de la membrana aplicando vacío, y la membrana se lavó subsiguientemente dos veces con 50 ml de tampón RCM. La reducción de los puentes disulfuro se realizó mediante la adición de 50 ml de ditiotretol 0,1M en RCM y la incubación a 37°C durante 1 h.
- 45 Tras la reducción, se aplicó vacío para eliminar la solución de ditiotretol del pocillo. Los pocillos se lavaron tres veces con 300 ml de agua antes de realizar la carboximetilación de los residuos de cisteína mediante la adición de 50 ml de ácido yodoacético 0,1 M en tampón RCM y una incubación a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 min.
- 50 Tras la carboximetilación, los pocillos se vaciaron con vacío y a continuación se lavaron tres veces con 300 ml de agua. La membrana de PVDF se bloqueó entonces, para evitar la adsorción de la endoglucosidasa, mediante la incubación de 100 ml de una solución acuosa al 1% de polivinilpirrolidona 360 a temperatura ambiente durante 1 hora. El reactivo de bloqueo se eliminó entonces mediante vacío suave seguido de tres lavados con 300 ml de agua.
- 55 Los oligosacáridos N-ligados se liberaron mediante la adición de 2,5 mU de péptido-N-glucosidasa F (N-Glucanasa recombinante, GLYKO, Novato, CA) y 0,1 mU de sialidasa (GLYKO, Novato, CA), para eliminar cualquier residuo monosacárido potencialmente cargado, en un volumen final de 25 ml en NaHCO_3 20 mM, pH 7,0). La digestión se realizó durante 3 horas a 37°C.
- 60 **Método de liberación de oligosacáridos para anticuerpos en solución**
- Entre 40 y 50 μ g de anticuerpo se mezclaron con 2,5 mU de PNGasa F (Glyko, U.S.A.) en Tris 2 mM, pH 7,0 en un volumen final de 25 microlitros y la mezcla se incubó durante 3 horas a 37°C.
- 65 **Utilización de la digestión con endoglucosidasa H de los oligosacáridos liberados con PNGasa F para la asignación de estructuras de oligosacáridos bisectados híbridos con los picos de oligosacáridos neutros de EM-MALDI/TOF**

Los oligosacáridos liberados con PNGasa F se digirieron a continuación con endoglucosidasa H (EC 3.2.1.96). Para la digestión con Endo H, se añadieron 15 mU de Endo H (Roche, Suiza) a la digestión de PNGasa F (método anterior para anticuerpo en solución) para proporcionar un volumen final de 30 microlitros, y la mezcla se incubó durante 3 horas a 37°C. La endo H escinde entre los residuos N-acetilglucosamina del núcleo chitobiosa de los oligosacáridos N-ligados. La enzima solo puede digerir oligomanosa y la mayoría de glucanos de tipo híbrido, mientras que los oligosacáridos de tipo complejo no se hidrolizan.

Preparación de muestras para EM MALDI/TOF

Las digestiones enzimáticas que contienen los oligosacáridos liberados se incubaron durante 3 h adicionales a temperatura ambiente tras la adición de ácido acético hasta una concentración final de 150 mM, y a continuación se hicieron pasar a través de una resina de intercambio de cationes de 0,6 ml (resina AG50W-X8, forma hidrogenada, tamaño de poro 100-200, BioRad, Suiza) empaquetada en una columna de cromatografía micro-bio-spin (BioRad, Suiza) para eliminar los cationes y proteínas. Un microlitro de la muestra resultante se aplicó en una placa diana de acero inoxidable, y se mezcló sobre la placa con 1 µl de matriz sDHB. La matriz sDRB se preparó disolviendo 2 mg de ácido 2,5-dihidroxibenzoico más 0,1 mg de ácido 5-metoxisalicílico en 1 ml de etanol/ cloruro sódico acuoso 10 mM 1:1 (v/v). Las muestras se secaron al aire, se aplicaron 0,2 µl de etanol y finalmente las muestras se dejaron recristalizar al aire.

EM-MALDI/TOF

El espectrómetro de masas MALDI-TOF utilizado para adquirir los espectros de masas fue un Voyager Elite (Perspective Biosystems). El instrumento se operó en configuración lineal, con una aceleración de 20 kV y un retraso de 80 ns. Se utilizó una calibración externa utilizando estándares de oligosacárido para la asignación de masa de los iones. Los espectros de 200 disparos láser se sumaron para obtener el espectro final.

Ensayo de unión a antígeno

Se analizó la unión de las variantes humanizadas de anticuerpo monomérico purificado al receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR, también denominado en la literatura HER-1 o ErbB1) sobre la línea celular epidérmica humana A431, utilizando un ensayo basado en la citometría de flujo. 200.000 células (por ejemplo, de la línea celular humana A431) en 180 µl de tampón FACS (PBS que contiene FCS al 2% y EDTA 5 mM) se transfirieron a tubos de poliestireno de 5 µl y se añadieron 20 µl de muestras concentradas 10 veces de anticuerpo anti-EGFR (anticuerpo primario) (1-5000 ng/ml concentración final) o sólo PBS. Tras mezclar suavemente las muestras, los tubos se incubaron a 4°C durante 30 min en la oscuridad. A continuación, las muestras se lavaron dos veces con tampón FACS y se centrifugaron a 300 x g durante 3 min. El sobrenadante se eliminó por aspiración y las células se recogieron en 50 µl de tampón FACS y se añadieron 2 µl de fragmentos de anticuerpo secundario (F(ab')₂-FITC específico anti-Fc (Jackson Immuno Research Laboratories, USA) y los tubos se incubaron a 4°C durante 30 min. Las muestras se lavaron dos veces con tampón FACS y se recogieron en 500 µl de tampón FACS para su análisis mediante citometría de flujo. La unión se determina mediante la representación de la media geométrica de la fluorescencia frente a las concentraciones de anticuerpo.

Unión de glucovariantes IgG1 monoméricas a una línea celular CHO que expresa FcγRIIIA

Las células CHO se transfectaron mediante electroporación (280 V, 950 mF, 0,4 cm) con un vector de expresión que codifica la cadena α y la cadena γ del Fc gammaRIIIA-Val158. Los transfectantes se seleccionaron mediante la adición de 6 µg/ml de puomicina y los clones estables se analizaron mediante FACS utilizando 10 µl de anticuerpo monoclonal anti-FcγRIIIA 3G8 conjugado con FITC (BD Biosciences, Allschwill/ Suiza) para 10⁶ células. Se realizó la unión de la IgG1 a las células CHO que expresan el Fc gammaRIIIA-Val158. Brevemente, se añadieron los fragmentos F(ab')₂ anti-FcγRIIIA 3G8 (Ansell, Bayport, MN/USA) a una concentración de 10 µg/ml para competir con la unión de las glucovariantes de anticuerpo (3 µg/ml). La intensidad de la fluorescencia referente a las variantes de anticuerpo unido se determinó en un FACSCalibur (BD Biosciences, Allschwil /Suiza).

Ensayo de CCD A

Se utilizaron células mononucleares de sangre periférica humana (CMSP) como células efectoras y se prepararon utilizando un Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, MO63178 USA) siguiendo esencialmente las instrucciones del fabricante. En breve, se recogió sangre venosa de voluntarios sanos en jeringas heparinizadas. La sangre se diluyó 1: 0,75-1,3 con PBS (que no contiene Ca⁺⁺ o Mg⁺⁺) y se separó en capas en un Histopaque-1077. El gradiente se centrifugó a 400 x g durante 30 min. a temperatura ambiente (TA) sin freno. La interfase que contiene las CMSP se recolectaron y se lavó con PBS (50 ml de células PER a partir de dos gradientes) y se recogieron mediante centrifugación a 300 x g durante 10 minutos a TA. Tras la resuspensión del botón con PBS, las CMSP se contaron y se lavaron una segunda vez mediante centrifugación a 200 x g durante 10 minutos a TA. Las células entonces se resuspendieron en el medio apropiado para los subsiguientes procedimientos.

La proporción entre efectora y diana utilizada para los ensayos de CCDA fue de 25:1 y de 10:1 para las células CMSP y NK, respectivamente. Las células efectoras se prepararon en medio AIM-V a la concentración apropiada para añadir 50 µl por pocillo de las placas de 96 pocillos de fondo redondeado. Las células diana fueron células que expresan el EGFR humano (por ejemplo, A431, EBC-1 o LN229) que habían crecido en DMEM que contiene un 10% de FCS. Las células diana se lavaron en PBS, se contaron y se resuspendieron en AIM.V a 0,3 millones por ml para añadir 30.000 células en 100 µl por micropocillo. Los anticuerpos se diluyeron en AIM-V, se añadieron en 50 µl a las células diana presembradas y se dejaron unir a las células diana durante 10 minutos a TA. Luego se añadieron las células efectoras y la placa se incubó durante 4 horas a 37°C en una atmósfera humidificada que contiene CO₂ al 5%. La muerte de las células diana se valoró midiendo la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) de las células dañadas utilizando el equipo Cytotoxicity Detection kit (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suiza). Tras la incubación de 4 horas, las placas se centrifugaron a 800 x g. Se transfirieron 100 µl de sobrenadante de cada pocillo a una nueva placa de 96 pocillos de fondo plano transparente. Se añadieron 100 µl de tampón de sustrato coloreado del equipo por pocillo. Se determinaron los valores de Vmax de la reacción de color en un lector de ELISA a 490 nm durante al menos 10 min. utilizando el programa SOFTmax PRO (Molecular Devices, Sunnyvale, CA94089, USA). La liberación espontánea de LDH se midió en los pocillos que contienen sólo células diana y efectoras pero no anticuerpos. La liberación máxima se determinó en los pocillos que contienen sólo células diana y Triton X-100 al 1%. El porcentaje de muerte mediada por el anticuerpo específico se calculó como sigue: $((x - SR)/(MR - SR)) \times 100$, en la que x es la media de Vmax a una concentración de anticuerpo específico, SR es la media de las Vmax de liberación espontánea y MR es la media de las Vmax de liberación máxima.

Ejemplo 2

Resultados y discusión

La comparación de la unión al receptor EGF humano de las variantes de anticuerpo I-HHA, I-HHB, I-HHC, I-HLA, I-HLB, I-HLC, I-HLA1, I-HLA2, I-HLA3, I-HLA4, I-HLA5, I-HLA6, I-HLA7, I-HLA8, I-HLA9, I-HHD, I-HHE, I-HHF e I-HHG, acomplejadas con la cadena ligera del ICR62 quimérico o con las cadenas ligeras de ICR62 humanizados (I-KA, I-KB o I-KC) y el anticuerpo ch-ICR62 quimérico parental, muestra que todos los anticuerpos poseen valores de CE₅₀ similares dentro de una unidad logarítmica. Sólo la I-HHA posee una actividad de unión fuertemente reducida (véase la Figura 2). La Figura 1 muestra la actividad funcional de las cadenas de polipéptido ICR62 quimérico individuales (ch-ICR62) cuando se combinan con las construcciones humanizadas I-HHC y I-KB, respectivamente. En este experimento, la cadena ligera, la cadena pesada o ambas cadenas de ch-ICR62 simultáneamente se reemplazaron por las construcciones humanizadas anteriormente mencionadas. Esto demuestra que la formación de la interfaz VH/VL parece funcionar tanto en el anticuerpo de roedor como en las construcciones humanizadas.

Como se muestra en la Figura 2, la cadena pesada humanizada de 1-HILA no pudo restaurar la actividad de unión con la cadena ligera I-KA o I-KB. Como el I-HLA mostró unión tanto con I-KA como con I-KB, los presentes inventores concluyeron que la cadena pesada de I-HHA no es funcional en la unión de antígenos. Las Figuras 1 y 2, combinadas con la Figura 3, muestran que las construcciones de la cadena ligera I-KA, I-KB e I-KC tiene un comportamiento en su unión que es indistinguible de su homólogo de roedor. La variante I-KC no posee ninguna retromutación, y además tiene el CDR1 parcialmente humanizado, de forma que los residuos 24-29 pueden ser derivados de la secuencia de aceptor humano (A30 de VK1, como se ha mencionado anteriormente).

En la serie I-HHA, I-HHB e I-HHC, solo las últimas dos variantes mostraron un comportamiento de unión satisfactorio (Figuras 2 y 3). El análisis de la secuencia de 1-HHA reveló tres potenciales residuos de aminoácido responsables de este comportamiento: Lys33, His35 y Tyr50. Las construcciones que poseían la Lys33 reemplazada por tirosina mostraron una buena unión, así como las construcciones con la Tyr50 reemplazada por triptófano. Sólo cuando estos dos residuos se reemplazaron con alanina y glicina, respectivamente, se perdió la unión. Como I-HHC no mostró una mayor unión que I-HHB, los presentes inventores concluyeron que los residuos Asn60, Glu61, Lys64 y Ser65 no han de ser necesariamente de origen roedor; o pueden reemplazarse por Ala, Gln, Gln y Gly, respectivamente. Este procedimiento conduce a una construcción en la que la CDR2 está más humanizada, ya que las posiciones de aminoácido de 60 a 65 son parte de la definición de CDR de Kabat, pero no es necesario injertar los residuos donantes de roedor para este anticuerpo.

Las Figuras 4 y 5 comparan las construcciones de la serie I-HLA1, I-HLA2, I-HLA3, I-HLA4, I-HLA5 y I-HLA6. El mejor comportamiento de unión se observó en las construcciones ch-ICR62, I-HLA1 e I-HLA2, con un valor de CE₅₀ de aprox. 300 ng/ml. El resto de construcciones mostraban este valor aumentado con un factor de dos, y por lo tanto mostraron una actividad de unión ligeramente reducida. La primera conclusión de estos datos es que, dentro de la CDR1 de Kabat, las sustituciones Lys33Tyr e Ile34Met se toleraban. Estas dos posiciones están localizadas dentro de la definición de Kabat de la CDR1, pero fuera de las fronteras de CDR de Chothia (que se basaron en un análisis estructural en lugar de un análisis de la secuencia). En la última parte de CDR1, entonces, al menos cierta promiscuidad está permitida.

La segunda conclusión es que, en la CDR2, además del reemplazo anteriormente mencionado de los residuos Asn60 y Glu61 por los residuos que no son de donante, también se permitieron las sustituciones no de donante

Asn60Ser, Glu61Pro y Lys62Ser en la CDR de Kabat. Estos residuos se derivaron de la secuencia aceptora IGHV5-51 de línea germinal humana, que se utilizó como secuencia aceptor FR3. Las construcciones I-HLA3 y I-HLA4 difieren de la I-HLA1 e I-HLA2 sólo por la eliminación de la retromutación Phe27Tyr, y tanto las construcciones I-HLA3 como I-HLA4 pierden afinidad en comparación con su construcción parental. Por lo tanto, la tercera conclusión de la comparación de I-HLA1, I-HLA2, I-HLA3, I-HLA4, I-HLA5 y I-HLA6 es que la Phe27 está involucrada en la unión a antígeno, directamente o indirectamente, a través de la modificación de la conformación del bucle de la CDR1.

Las variantes I-HLA5 y I-HLA6 poseen la FR1 de I-HLA1 y I-HLA2, respectivamente, reemplazada por otra secuencia aceptora de línea germinal con la Phe27 presente naturalmente (es decir, IGHV1-58). Esto sólo pudo conseguirse mediante la introducción simultánea de varias mutaciones distintas, que son: Val2Met, Ala9Pro y Ala16Thr. Mediante este procedimiento, el efecto beneficioso de (re)introducir la Phe27 se anuló de nuevo.

La construcción I-HLA7 se analizó para determinar si la restauración de los residuos donantes adicionales en las CDR1 y CDR2 de la cadena pesada de la construcción I-HLA6 podía restaurar la actividad completa de unión en comparación con la ICR62. Como se muestra en la Figura 6, este no fue el caso.

Como se muestra en las Figuras 7 y 8, se analizaron dos construcciones adicionales, I-HLA8 y I-HLA9, para determinar si podía conseguirse la actividad completa de unión en comparación con la ch-ICR62. Empezando a partir de la construcción I-HHB, las regiones FR1 se reemplazaron con las regiones FR1 con una homología máxima dentro de la región CDR1 de Chothia. La construcción I-HLA8 posee la FR1 de la secuencia IGHV1-58, y la I-HLA9 posee la región IGHV5-51 FR1. Ambas construcciones unen el antígeno al menos como el anticuerpo ch-ICR62. La construcción I-HLA8, de hecho, puede unirse incluso mejor, con la CE₅₀ reducida en un factor de 2. La construcción I-HLA8 posee la misma secuencia FR1 que las construcciones I-HLA5 y I-HLA6 y por lo tanto posee los mismos residuos no donantes (es decir, Val2Met, Ala9Pro y Ala16Thr), lo que sugiere que la presencia de estos residuos no donantes no posee un efecto negativo en la unión. Las mutaciones no beneficiosas que ocurren en I-HLA5 y 6 surgen de la combinación de una FR1 VH1 emparejada con una FR3 VH5, que potencialmente puede compensarse si tiene una FR1 y una FR3 de la misma familia VH.

En la Figura 8 se muestran las construcciones que contienen residuos no donantes dentro de las CDR. Así, estas construcciones están incluso más humanizadas en la CDR ya que los residuos no donantes aparecen en las regiones marco humanas que se escogieron para estas construcciones. Las construcciones I-HHE (His35Ser), I-HHF (Thr58Asn) e I-HHG (Ser57Ala) poseen todas ellas un residuo en la CDR1 o CDR2 que está humanizado (en comparación con la construcción I-HHB). La construcción I-HHD (Gly24Ala) también se analizó. I-HHF mostró una unión reducida, lo que indica la importancia de la Thr58. Al contrario del residuo 58 de la CDR de Kabat, el aminoácido 57 es más tolerante a las sustituciones, ya que la mutación Ser57Ala aparentemente no ejerce ninguna influencia sobre la unión (Figura 8).

Como la región FR3 de IGHV5-51 parecía mostrar propiedades prometedoras en las construcciones I-HLA1 y 2, y la FR1 de la misma secuencia de línea germinal demostró ser útil en la construcción I-HLA9, se diseñaron las FR1, FR2 y FR3 de IGHV5-51 para su uso conjunto como un aceptor para el injerto de bucles.

Resumen del análisis de los residuos canónicos en las construcciones ICR62 humanizadas:

VL:	posición 2 de Kabat: Ile probablemente necesario. posición 71 de Kabat: Ile o Phe permitido.
VB:	pos. 24, Gly, Thr, Ala, Val, Ser permitido. pos. 26, Gly permitido. pos. 29, Phe, Ile, Leu, Val, Ser permitido. pos. 34, Ile, Met, Leu, Val, Trp, Tyr, Thr permitido. pos. 71, Ala, Leu, Val, Thr permitido. pos 94, Arg, Gly, Asn, Lys, Ser, His, Thr, Ala permitido.

Resultados de los experimentos de CCDA

La Figura 9 muestra una comparación de la citotoxicidad celular mediada por anticuerpo (CCDA) de las distintas glicofomas del anticuerpo ICR62 quimérico, así como la variante humanizada I-HLA4. Las diferentes glicofomas están marcadas mediante una etiqueta que indica no glicomodificado (WT), glicofoma 1 (G1) o Glicofoma 2 (G2). "G1" se refiere a una glicomodificación del anticuerpo mediante coexpresión con la GnTIII. "G2" se refiere a una glicomodificación del anticuerpo mediante la coexpresión con GoTIII y ManII. "WT" se refiere a los anticuerpos que no fueron glicomodificados. La cadena ligera de todas las construcciones humanizadas es la variante I-KC, y no se etiquetó explícitamente.

El anticuerpo quimérico, así como el humanizado, se mejoraron en cuanto a potencia y eficacia mediante las dos estrategias diferentes de glicomodificación. La construcción ch-ICR62 funcionó ligeramente mejor que la I-HLA4 para la forma no glicomodificada o las glicofomas, respectivamente. Como se ha visto en la Figura 4, cuando se

compararon las afinidades de los dos anticuerpos frente a su antígeno, ch-ICR62 poseía un valor de CE_{50} dos veces menor. Esta diferencia en la afinidad se refleja aquí en diferencias en la eficacia.

La Figura 10 muestra una comparación de la citotoxicidad celular mediada por anticuerpo (CCDA) entre la forma no glicosmodificada ("salvaje") y la glicoforma G2 de las construcciones de los anticuerpos ICR62 humanizados I-HHB y I-HLA7. Los mismos anticuerpos se aplicaron en dos líneas celulares diana diferentes. En el panel A de la Figura 10, se utilizó la línea celular diana LN229; y en el panel B de la Figura 10, se utilizó la línea celular A431. Las células A431 son aparentemente más susceptibles a la muerte celular mediada por anticuerpo que las células LN229. De forma más importante, la glicosmodificación mejoró la potencia de ambos anticuerpos. Este efecto pareció ser más pronunciado para I-HLA7 que para I-HHB. El porcentaje de muerte celular a la concentración máxima de anticuerpo para I-HHB pudo cambiarse de $\square$ 30% a -40% introduciendo la variante glicosmodificada G2, cuando se utilizó la línea celular diana LN229. Cuando se utilizó la línea celular A431, este valor aparentemente quedó sin modificación. Este comportamiento fue completamente diferente para el anticuerpo I-HLA7. La muerte de las células diana a la concentración máxima de anticuerpo se modificó de alrededor del 10% a alrededor del 50%, para las células LN229, y de alrededor del 40% a alrededor del 70% para las células A431 mediante la introducción de variantes glicosmodificadas G2. En este caso, a pesar de tener una actividad menor en el anticuerpo no glicosmodificado de IHLA7 en relación con I-HHB, el grado de actividad es inverso para los anticuerpos glicosmodificados. Las Figuras 11 y 12 también muestran comparativas de formas no glicosmodificadas (WT) y glicoformas G2 de las construcciones de anticuerpo ICR62 quimérico y ICR62 humanizado, I-HHB e I-HLA7.

Ejemplo 3

Estudio de toxicidad preliminar mediante administración intravenosa (bolo) a monos cynomolgus - Análisis bioanalítico

INTRODUCCIÓN

Ensayo anti-EGFR glicosmodificado

Este análisis bioanalítico describe la determinación de anti-EGFR en muestras originadas de monos cynomolgus tras la administración intravenosa (en bolo) de anti-EGFR (anticuerpo anti-EGFR glicosmodificado recombinante producido a partir de células de mamífero transfectadas en cultivo con vectores de expresión de anticuerpo que son portadores de los genes de la cadena pesada IHHB y la cadena ligera I-KC como se han descrito anteriormente, y purificados como se ha descrito anteriormente) como el descrito en el protocolo que se indica aquí a continuación. Un total de 78 muestras de suero de mono se almacenaron congeladas a alrededor de -20°C hasta su uso.

Los métodos bioanalíticos utilizados para la determinación de anti-EGFR utilizaron un método de ELISA para medir las concentraciones en suero de anti-EGFR. Los criterios de aceptación se fijaron al $\pm 20\%$ ($\pm 25\%$ control calidad bajo) para la precisión y la inexactitud.

MATERIALES y MÉTODOS

Objetivo: El objetivo de este estudio fue la valoración del potencial tóxico sistémico de la administración intravenosa (en bolo) de glico-mAb (anti-EGFR) a monos cynomolgus tras un periodo de recuperación de 8 semanas.

TABLA 8

Modelo animal	Monos cynomolgus, aceptados por las agencias reguladoras, disponibles datos de antecedentes.
Justificación para utilizar el primate	El primate fue la especie no roedora de elección ya que por sí misma conserva dos parámetros críticos: reconocimiento del antígeno EGFR por el anticuerpo de prueba, y reconocimiento de la región Fc del anticuerpo de prueba por los receptores Fc del sistema inmune.
Ruta	Intravenosa (bolo), para simular las condiciones de administración clínica.

TABLA 9: Grupos de tratamiento y dosis

Grupo	1	2	3
Compuesto	<u>Glyco-mAb(Anti-EGFR)</u>		
Dosis (mg/kg/día)	1,5	4,5	12

Racional para la selección del nivel de dosificación

1,5-7,5 mg/kg es el rango esperado para los estudios humanos (siendo 7,5 mg/kg la dosis correspondiente para un

compuesto similar en humanos).

TABLA 10: Identidad de los grupos de tratamiento

Grupo	Tratamiento	Dosis (mg/kg/día) #	Número de animales		Números Id. animal	
			Macho	Hembra	Macho	Hembra
1	Glico-mAb (Anti-EGFR)	1,5	1	1	623	590
2	Glico-mAb (Anti-EGFR)	4,5	1	1	461	462
3	Glico-mAb (Anti-EGFR)	12	1	1	463	612
# Expresado en términos de la sustancia de prueba tal y como se suministra.						

5

TABLA 11: Animales

Especies	Mono Cynomolgus (criados para este propósito).
Edad recibido	Aproximadamente 15 meses.
Rango de peso pedido	De 1,5 a 2,5 kg.

10

TABLA 12: Administración de anti-EGFR

Vía	Inyección intravenosa
Tratado a	Dosis constantes en mg/kg/ocasión.
Volumen de la dosis	Calculado previamente, en base al peso corporal registrado más reciente
Volumen de dosificación individual	1 ml/kg/día
Frecuencia	Días 1, 8, 15 y 22, inmediatamente antes de alimentarse
Secuencia	Por grupo
Puntos de dosificación	utilizando la vena izquierda safena
Inyección	Bolo, nueva aguja desechable estéril por animal
Formulación	Se mantuvo un registro de la utilización de formulaciones en función del peso. Este balance se comparó con la utilización esperada como comprobación de la correcta administración

TABLA 13: Observaciones clínicas

Animales y sus bandejas de jaula	Inspección visual al menos dos veces diarias en busca de evidencia de reacción al tratamiento o mala salud.
Desviaciones de la normalidad registradas en el momento respecto a	Naturaleza y gravedad Fecha y momento de aparición Duración y progreso del estado observado
Examen físico	Una vez cada semana a todos los animales
Registro diario de las bandejas de jaula	En busca de vómitos, sangre, diarrea, etc

15

TABLA 14: Frecuencia de dosificación

Frecuencia	1. Inmediatamente pre-dosificación. 2. ½ a 2 horas tras completarse la dosificación. 3. Tan tarde como sea posible en la jornada laboral.
Puntos de inyección	Diaria

20

TABLA 15: Toxicocinética

Día	Animales	Tiempos de muestreo en horas tras la dosificación.
1	Todos los animales	1, 4, 12, 24, 72, 120
8	Todos los animales	Predosificación, 1 hora tras la dosificación (169 horas tras la dosis del día 1).

15	Todos los animales	Predosificación, 1 hora tras la dosificación (337 horas tras la dosis del día 1).
22	Todos los animales	Predosificación, 1 hora tras la dosificación (505 horas tras la dosis del día 1).
29	Todos los animales	672 horas tras la dosis del día 1

TABLA 16: Muestras

Punto de muestreo	Vena adecuada
Volumen de anticoagulante/ muestra	Sin anticoagulante/ 0,7 ml.
Número total de muestras tomadas	104
Separación de suero	Mediante centrifugación a temperatura ambiente a no ser que se indique de otro modo para proporcionar un mínimo de 0,3 ml, cuando sea posible.
Almacenamiento del suero	Tubos de plástico etiquetado de forma apropiada. Congelados a baja temperatura (aproximadamente -20°C), mientras no se realiza el bioanálisis
Histología	

5

TABLA 17: Fijación del tejido

Estándar	Formalina tamponada neutra al 10%
Otras	Testículos y epidídimos: inicialmente en fluido de Bouin. Ojos: Inicialmente en fluido de Davidson.

TABLA 18: Histología

10

Procesado	Todos los animales
Tinción de rutina	Secciones de 4-5 µm teñidas con hematoxilina y eosina

Procedimiento del inmunoensayo

15 Una placa se recubrió con 100 µl por pocillo de una solución de recubrimiento (5 ml de IgG de oveja anti-humano (IgG absorbida de mono, the Binding Site, UK) añadida a 11495 µl de tampón bicarbonato (0,05M, pH 9,6) y se incubó durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con 400 µl por pocillo de solución de lavado (PBS (Sigma Chemical Co., UK) al 0,01% (v/v) Triton-X100 (Sigma Chemical Co., UK)) y se golpeó suavemente para secarla.

20 Se añadieron 200 µl por pocillo de tampón de ensayo (BSA al 1% p/v, Sigma Chemical Co., UK) y se incubó durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con 400 µl por pocillo de solución de lavado y se golpeó suavemente para secarla. Los estándares de calibración, controles de calidad (CC) y/o muestras se añadieron a 100 µl por pocillo y se incubaron durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente, tras lo cual la placa se lavó 3 veces con 400 µl por pocillo de solución de lavado y se golpeó suavemente para secarla.

25 La solución de conjugación (6 µl de conjugado IgG kappa anti-humano de cabra-HRP (Bethyl Laboratories Inc., USA) se añadió a 12 ml de tampón de ensayo) se añadió a 100 µl por pocillo y se incubó durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con 400 µl por pocillo de solución de lavado y se golpeó suavemente para secarla.

30 Se añadió 100 µl de trimetilbenzidina (TMB; Europa Bioproducts, Ely, UK) por pocillo. La placa se cubrió y se incubó durante aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente. Entonces se añadieron 100 µl de solución de parada de la reacción (HCl 0,5 M, Fisher, UK) a cada pocillo. Las absorbancias se leyeron a 450 nm (filtro de referencia 630 nm) en un lector de microplaca DYNATECH MRX (Mettler Instruments, UK).

35 RESULTADOS y DISCUSIÓN

Análisis de las muestras de prueba

40 Las concentraciones de anti-EGFR se midieron mediante un método de inmunoensayo (ELISA) en 78 muestras de suero de mono generadas de acuerdo con el protocolo descrito en este documento anteriormente. Estos resultados se presentan en las Tablas 19-21, más adelante.

TABLA 19

Concentración en suero de anti-EGFR en suero de mono (µg/ml) tras la administración intravenosa de 1,5 mg/kg de anti-EGFR en los días 1, 8, 15 y 22 (GRUPO 1)				
Intervalo	Número del animal		Media	DE
	1M 623	1F 590		
Día 1 1 hora	33,42	30,86	32,14	1,8
Día 1 4 horas	27,33	27,49	27,41	0,1
Día 1 12 horas	13,09	17,01	15,05	2,8
Día 1 24 horas	9,656	9,468	9,562	0,1
Día 1 72 horas	2,528	0,786	1,657	1,2
Día 1 120 horas	0,845	0,431	0,638	0,3
Día 8 predosis	0,538	0,287	0,413	0,2
Día 8 1 hora	30,02	19,07	24,55	7,7
Día 15 predosis	0,902	0,382	0,642	0,4
Día 15 1 hora	17,91	33,08	25,50	10,7
Día 22 predosis	1,065	0,595	0,830	0,3
Día 22 1 hora	19,41	33,00	26,21	9,6
Día 1 672 horas	1,202	0,362	0,782	0,6
DE desviación estándar				

5

TABLA 20

Concentración en suero de anti-EGFR en suero de mono (µg/ml) tras la administración intravenosa de 5,0 mg/kg de anti-EGFR en los días 1, 8, 15 y 22 (GRUPO 2)				
Intervalo	Número del animal		Media	DE
	2M 461	2F 462		
Día 1 1 hora	32,45	29,51	30,98	2,1
Día 1 4 horas	32,39	29,57	30,98	2,0
Día 1 12 horas	28,05	25,88	26,97	1,5
Día 1 24 horas	23,70	23,78	23,74	0,1
Día 1 72 horas	14,03	14,38	14,21	0,2
Día 1 120 horas	10,42	8,137	9,279	1,6
Día 8 predosis	4,672	3,683	4,178	0,7
Día 8 1 hora	25,91	31,06	28,49	3,6
Día 15 predosis	5,752	5,450	5,601	0,2
Día 15 1 hora	32,20	35,38	33,79	2,2
Día 22 predosis	BLQ	6,497	3,249	-
Día 22 1 hora	26,98	30,23	28,61	2,3
Día 1 672 horas	BLQ	4,845	2,423	-
BLQ por debajo del límite de cuantificación, < 0,195 µg/ml)				
DE desviación estándar				
Note: BLQ se introdujo como cero en los cálculos				

TABLA 21

Concentración en suero de anti-EGFR en suero de mono (µg/ml) tras la administración intravenosa de 15 mg/kg de anti-EGFR en los días 1, 8, 15 y 22 (GRUPO 3)				
Intervalo	Número del animal		Media	DE
	3M 463	3F 612		
Día 1 1 hora	262,2	168,0	215,1	66,6
Día 1 4 horas	223,3	174,5	198,9	34,5
Día 1 12 horas	164,9	165,7	165,3	0,6
Día 1 24 horas	141,7	146,0	143,9	3,0
Día 1 72 horas	99,54	86,64	93,09	9,1
Día 1 120 horas	86,64	69,08	77,86	12,4
Día 8 predosis	65,86	45,21	55,54	14,6
Día 8 1 hora	282,1	209,9	246,0	51,1
Día 15 predosis	98,43	71,21	84,82	19,2
Día 15 1 hora	3859	231,4	308,7	109,2

10

Día 22 predosis	117,3	105,6	111,5	8,3
Día 22 1 hora	234,1	402,5	318,3	119,1
Día 1 672 horas	127,5	122,9	125,2	3,3
DE desviación estándar				

Ejemplo 4

Estudio preliminar de toxicidad mediante la administración intravenosa (en bolo) a mono cynomolgus – Resumen de la toxicocinética

Se administraron dosis de anti-EGFR por bolo intravenoso a tres grupos de monos cynomolgus (1 macho y 1 hembra por grupo) en los días 1, 8, 15 y 22 de un estudio de toxicidad de 28 días para valorar la exposición sistémica de los animales al anti-EGFR. Las concentraciones en suero de anti-EGFR en las muestras recogidas hasta 672 horas tras la primera dosis se determinaron mediante un método de inmunoensayo. El análisis farmacocinético de los datos de concentración en suero - tiempo resultó en los siguientes parámetros farmacocinéticos:

TABLA 22

Dosis (mg/kg)	Animal	C _{max} (µg/mL)	T _{max} (h)	AUC _{0-∞} (µg.h/mL)	AUC ₀₋₆₇₂ (µg.h/mL)	CL (mL/h/kg)	V _{ss} (mL/Kg)	k (1/h)	t _{1/2} (h)
1,5	1M623	33,42	1	830,4	849,4	1,778	60,79	0,0214	32,5
1,5	1F590	30,86	1	748,4	774,9 ^a	1,962 ^a	57,85 ^a	0,0105 ^a	66,0 ^a
4,5	2M46)	32,45	1	2537	3005	1,488	133,6	0,0110	63,1
4,5	2F462	29,57	4	2378	2719	1,663	133,2	0,0121	57,4
12	3M463	262,2	1	18310	29870 ^a	0,4058 ^a	71,33 ^a	0,0056 ^a	124,3 ^a
12	3F612	174,5	4	15980	21400 ^a	0,5552 ^a	66,94 ^a	0,0082 ^a	84,4 ^a
a	El valor es una estimación ya que los datos no cumplen todos los criterios de aceptación definidos en el procesamiento de datos y debe tratarse con cautela								

Las relaciones entre las áreas bajo las curvas de concentración de anti-EGFR en suero-tiempo (AUC₁₆₈) y el nivel de dosificación del día 1 se presentan a continuación:

TABLA 23

Nivel de dosificación (mg/kg/ocasión)	Nivel de dosificación proporción	Proporción del AUC ₁₆₈	
		Machos	Hembras
1,5	1	1	1
4,5	3,0	3,1	3,2
12	8,0	22,0	21,4

La tasa y extensión de la exposición sistémica de los monos al anti-EGFR, caracterizada por el AUC₁₆₈, aumentó aproximadamente proporcionalmente al aumentar la dosis por encima del rango de dosis de 1,5 a 4,5 mg/kg/ocasión pero el aumento era mayor al aumento proporcional de la dosis a lo largo del rango de dosis de 4,5 a 12 mg/kg/ocasión en el día 1. A la dosis más elevada (12 mg/kg/ ocasión) el AUC₁₆₈ fue case 2,8 veces mayor que el valor predecible por una relación lineal.

La extensión (AUC₁₆₈) de la exposición sistémica de los monos hembra al anti-EGFR en general fue similar a la exposición en monos machos.

Tras repetidas dosis intravenosas, las concentraciones en suero de anti-EGFR pre-dosis en general fueron superiores que los valores obtenidos tras una sola dosis e indicó que había acumulación del anti-EGFR en suero a lo largo del periodo de estudio.

La vida media terminal no pudo estimarse adecuadamente para todos los animales, pero pudo estimarse en el rango de 32,5 a 63,1 horas, y pareció aumentar con la dosis en los animales macho. La eliminación total en suero de anti-EGFR pareció ser independiente de la dosis a lo largo del rango 1,5 – 4,5 mg/kg/ocasión pero se redujo en el mayor nivel de dosificación en monos machos y hembras.

En conclusión, la extensión de la exposición sistémica de los monos cynomolgus al anti-EGFR pareció estar caracterizada por una cinética no lineal (dependiente de dosis) a lo largo del rango de dosis de 1,5 a 12 mg/kg/ocasión el día 1 del estudio de toxicidad intravenosa. Aumentar la dosis de anti-EGFR, por encima de 4,5

mg/kg/ocasión probablemente resulta en una exposición sistémica mayor de la que podría predecirse de una respuesta lineal, lo cual es consistente con la posibilidad de un proceso de capacidad limitada de eliminación del anti-BGFR.

- 5 Además, el estudio también proporcionó evidencias de que en general no existían diferencias en la exposición sistémica de monos machos y hembras al anti-EGFR y de que existía una acumulación tras una repetida administración intravenosa.

Introducción

- 10 A tres grupos de un macho y una hembra de monos cynomolgus se les administró anti-EGFR mediante una inyección de bolo intravenoso, a niveles de dosificación de 1,5, 4,5 y 12 mg/kg/ocasión en los días 1, 8, 15 y 22 de un estudio de toxicidad preliminar. Las muestras de sangre se tomaron de cada animal en los siguientes intervalos tras la administración del día 1: 1, 4, 12, 24, 72 y 120 horas post-dosis. Además, se tomaron muestras pre-dosis y
15 tras 1 hora post-dosis en los días 8, 15 y 22, y a las 672 horas tras la primera dosis del día 1. El suero separado se congeló a alrededor de -20°C previamente al análisis de las concentraciones de suero de anti-EGFR mediante un método de inmunoensayo.

Abreviaciones

- 20 AUC Área bajo la curva de concentración sérica-tiempo hasta tiempo infinito
AUC₁₆₈ Área bajo la curva de concentración sérica-tiempo durante un intervalo de dosificación de 168 horas
BLQ Bajo el límite de cuantificación
ca Aproximadamente
25 CL Aclaramiento sérico total
Cmax Concentración sérica máxima
F Hembra
k Constante de proporción terminal
M Macho
30 t_{1/2} Semivida terminal
Tmax Momento en el que aparece la Cmax
Vss Volumen de distribución en estado estacionario

Anticuerpo utilizado para el estudio

- 35 El glico-mAb (anti-EGFR), un anticuerpo anti-EGFR modificado en la Fc para obtener una mayor afinidad en la unión al receptor de Fc-gammaRIII y una CCDA aumentada, se produjo, se purificó y se caracterizó tal y como se describe anteriormente. En resumen, el anticuerpo se produjo mediante la cotransfección de las células HEK-293-DNA con
40 vectores de plásmidos de DNA para la expresión de la cadena pesada del anticuerpo I-HHB, la cadena ligera del anticuerpo I-KC, GnT-III y ManI. Se utilizó una versión a una escala linealmente mayor del método de transfección descrito anteriormente, transfectando monocapas celulares cultivadas en botellas rotatorias en vez de en frascos T. Inmediatamente antes del paso cromatográfico de exclusión por tamaño descrito con anterioridad, en el proceso de purificación se incluyó un paso adicional de flujo a través de una cromatografía de intercambio aniónico mediante la utilización de una matriz de Q-sefarosa.

- 45 El patrón de glicosilación del anticuerpo modificado en la Fc se analizó tal y como se describe anteriormente mediante la utilización de pectometría EM-MALDI/TOF de oligosacáridos derivados de la Fc, liberados enzimáticamente. El perfil oligosacárido se muestra en la figura 23.

- 50 La unión a EGFR humano y al EGFR de mono se demostró mediante la unión de células completas, tal y como se describe anteriormente, mediante la utilización de células A431 y COS-7, respectivamente, y el análisis basado en FACS. Las curvas de unión se muestran en las figuras 24 y 25, respectivamente.

- 55 La mayor unión al receptor FcgammaRIII que resulta de la aplicación de la modificación de la Fc se demostró, tal y como se describe anteriormente, mediante la unión de células completas a células CHO diseñadas para la expresión superficial del FcgammaRIII humano, y mediante el análisis basado en FACS. Los resultados se muestran en la figura 26. Además, el anticuerpo diseñado tiene un grado equivalente al anticuerpo "glico-2" en cuanto a la modificación de la Fc (75% de los oligosacáridos de la Fc son de tipo no fucosilado) y esto se describe en otro documento (Ferrara, C. et al., J Biol Chem. 5 de diciembre de 2005; [publicación electrónica pendiente de impresión]). Tales anticuerpos modificados en la Fc tienen un incremento de afinidad de unión al FcgammaRIII
60 humano de hasta 50 veces en relación a los anticuerpos estándar no modificados en la Fc (constantes de disociación en equilibrio de 15 y 150 nM para las variantes polimórficas 158V y 158F del receptor humano frente a 750 y 5000 nM para las mismas variantes del receptor, respectivamente, cuando se une a anticuerpos IgG1 no modificados en la Fc).

- 65 La CCDA se midió, tal y como se describe anteriormente, mediante la utilización de dos líneas celulares diana;

células de carcinoma de pulmón A549 y células queratinocito de mono cynomolgus CYNOM-K1. Los resultados se muestran en las figuras 27 y 28, respectivamente.

Procesamiento de los datos

Los parámetros farmacocinéticos se calcularon mediante el programa de computadora WinNonlin Pro versión 3.3 (Pharsight Corporation, EE.UU.).

Todas las concentraciones de suero aportadas como parte de este estudio se describieron en 4 cifras significativas o 3 decimales. Los parámetros farmacocinéticos se describieron de la siguiente manera: C_{max}, AUC₁₆₈, CL y V_{ss} hasta 4 cifras significativas; k hasta 4 decimales; t_{1/2} hasta 1 decimal.

Los valores BLQ (<0,195 µg/mL) se introdujeron como cero en el procesamiento farmacocinético.

Análisis toxicológico

Las concentraciones séricas máximas de anti-EGFR (C_{max}) y sus momentos de aparición (T_{max}) fueron los valores observados. Se estimaron las áreas bajo la curva de concentración sérica de anti-EGFR-tiempo en un intervalo de dosificación de 168 horas (AUC₁₆₈) mediante la regla del trapecio lineal. En el cálculo de los valores de AUC₁₆₈ se estimaron las concentraciones séricas de anti-EGFR a las cero horas mediante extrapolación utilizando un análisis de regresión lineal-logarítmica, en base a los dos primeros tiempos de muestreo. No obstante, si la concentración sérica no disminuyó durante ese periodo, se consideró que la concentración sérica a las cero horas era equivalente a la concentración en el primer tiempo de muestreo. Se estimaron las áreas bajo la curva de concentración sérica de

$$AUC = AUC_{168} + C_{last}/k$$

anti-EGFR-tiempo hasta un tiempo infinito (AUC) mediante la siguiente expresión:

en la que C_{last} es la concentración sérica predicha en el último punto cuantificable de la muestra y k es la constante de proporción terminal.

Las constantes de proporción terminal (k) se estimaron mediante el ajuste de una regresión lineal de una concentración logarítmica frente al tiempo. Para considerar que la k estimada es fiable, se imponen los siguientes criterios:

1. Aparentemente, los puntos de datos terminales se distribuyeron aleatoriamente alrededor de una única línea recta (a la inspección visual)
2. Para la regresión se utilizaron un mínimo de 3 puntos de datos
3. El coeficiente de regresión fue ≥0,95, y la fracción de la varianza contabilizada fue ≥0,090
4. El intervalo que incluyen los puntos de datos escogidos para la regresión fue, al menos, dos veces mayor a la semivida en sí.

Las semividas terminales (t_{1/2}) se calcularon mediante ln2/k. El aclaramiento sérico total (CL) se calculó mediante dosis/AUC. El volumen de distribución en estado estacionario (V_{ss}) se calculó mediante dosis AUMC/AUC₂. La acumulación (R) se evaluó mediante la proporción entre la concentración mínima tras la última dosis (día 22) y la concentración mínima tras la primera dosis (día 1), es decir, la concentración sérica a las 672 horas/concentración sérica a las 168 horas (dosis previa el día 8).

Resultados y discusión

Se tomaron muestras de sangre hasta 120 horas después de la dosificación del día 1; antes de la dosis y 1 hora después de la dosis los días 8, 15 y 22, y a las 672 horas después de la dosificación del día 1 durante un estudio de toxicidad para evaluar la exposición sistémica de monos macho y hembra al anti-EGFR, después de la administración intravenosa en bolo de anti-EGFR a niveles de dosis de 1,5, 4,5 y 12 mg/kg/vez en los días 1, 8, 15 y 22 del estudio. En las tablas 27-29 se presentan las concentraciones séricas del anti-EGFR en las muestras tomadas a las 168 horas de la dosificación, y los perfiles de concentración sérica media-tiempo se ilustran en las figuras 18 y 19.

Los parámetros farmacocinéticos del anti-EGFR se presentan en la TABLA 50, y los valores del AUC₁₆₈ se resumen a continuación:

TABLA 24

Nivel de dosis	AUC ₁₆₈ (µg.h/ml)	
(mg/kg/vez)	Machos	Hembras
1,5	830,4	748,4
4,5	2537	2378
12	18310	15980

5 Habitualmente, los momentos en los que aparecen las concentraciones máximas (Tmax) fueron 1 hora después de la dosis (el primer punto de muestreo), pero en las hembras 2F462 (4,5 mg/kg) y 3F612 (12 mg/kg), aparecieron 4 horas después de la dosis (el segundo punto de muestreo). No obstante, para estos dos grupos de hembras, las concentraciones a las 4 horas de la dosis fueron muy similares a las concentraciones de la primera hora posterior a la dosis y, probablemente, formaron parte de la variabilidad del ensayo. Por consiguiente, es improbable que el retraso aparente del Tmax tenga alguna significación.

10 Se pudieron cuantificar concentraciones séricas de anti-EGFR previas a la siguiente dosis en todos los animales excepto en los machos 2M461 el día 22 (nivel de dosis de 4,5 mg/kg/vez) y por consiguiente, en general los animales estuvieron continuamente expuestos a concentraciones cuantificables de anti-EGFR durante la dosificación interna.

15 A continuación se presentan las relaciones entre las áreas bajo la curva de concentración sérica de anti-EGFR-tiempo (AUC₁₆₈) y el nivel de dosificación en el día 1:

20 TABLA 25

Nivel de dosis	Nivel de dosis	Proporción de AUC ₁₆₈	
(mg/kg/vez)	Proporción	Machos	Hembras
1,5	1	1	1
4,5	3,0	3,1	3,2
12	8,0	22,0	21,4

25 La proporción y grado de exposición sistémica de los monos al anti-EGFR, caracterizadas mediante el AUC₁₆₈, aumentó de manera aproximadamente proporcional al aumento de la dosis en el rango entre los 1,5 y los 4,5 mg/kg/vez, pero lo hizo más allá de la proporcionalidad respecto a la dosis en el rango de dosis de entre 4,5 y 12 mg/kg/vez el día 1. Con la dosis mayor (12 mg/kg/vez), el AUC₁₆₈ fue ca. 2,8 veces mayor a la predicha según la relación lineal (figura 20).

30 Habitualmente, el grado de exposición sistémica (AUC₁₆₈) de los monos hembra al anti-EGFR fue similar a la exposición de los monos macho.

35 Generalmente, tras repetidas dosis intravenosas, las concentraciones séricas de anti-EGFR previas a la dosis fueron mayores a los valores tras una única dosis (figuras 21-22) e indicaron la acumulación del anti-EGFR en el suero a lo largo del periodo del estudio. Habitualmente, esta acumulación fue menor en las hembras que en los machos, excepto en el nivel de dosis mayor. Las proporciones de concentraciones mínimas previas a la dosis tras la última dosis el día 22 (672 horas después de la dosis del día 1) respecto a la concentración mínima tras la primera dosis el día 1 se presentan en la TABLA 26, a continuación:

TABLA 26

Nivel de dosis (mg/kg/vez)	R	
	Machos	Hembras
1,5	2,23	1,26
4,5	-	1,32
12	1,94	2,72
*No se pudo calcular, ya que la concentración mínima estuvo BLQ		

Las constantes de proporción terminal (k), y las correspondientes semividas terminales ($t_{1/2}$), del anti-EGFR el día 1 se presentan en la TABLA 30. La semivida terminal no se pudo estimar adecuadamente en todos los animales, pero sí pudo estimarse en el rango de entre las 32,5 y las 63,1 horas, y resultó aumentar con la dosis en los animales macho. El aclaramiento sérico total del anti-EGFR resultó ser independiente de la dosis en el rango de 1,5-4,5 mg/kg/vez pero se redujo con el nivel mayor de dosis en los monos hembra y macho.

En conclusión, el grado de exposición sistémica de los monos cynomolgus al anti-EGFR pareció caracterizarse por una cinética no lineal (dosis-dependiente) en el rango de dosis de entre 1,5 y 12 mg/kg/vez el día 1 del estudio de toxicidad intravenoso. El incremento de la dosis de anti-EGFR por encima de los 4,5 mg/kg/vez probablemente resulte en una mayor exposición sistémica que podría predecirse a partir de una relación lineal, lo cual es congruente con la posibilidad de un proceso limitado de capacidad para la eliminación del anti-EGFR.

Además, el estudio también proporciona pruebas de que, en general, no hay diferencias en la exposición sistémica al anti-EGFR entre machos y hembras de mono, y de que se presentó acumulación tras la administración intravenosa repetida.

TABLA 27

Concentraciones séricas ($\mu\text{g/ml}$) de anti-EGFR en suero de mono tras la administración intravenosa de 1,5 mg/kg de anti-EGFR en los días 1, 8, 15 y 22		
Punto temporal	Número del animal	
	1M623	1F590
Día 1, hora 1	33,42	30,86
Día 1, hora 4	27,33	27,49
Día 1, hora 12	13,09	17,01
Día 1, hora 24	9,656	9,468
Día 1, hora 72	2,528	0,786
Día 1, hora 120	0,845	0,431
Día 8, antes de la dosis	0,538	0,287
Día 8, hora 1	30,02	19,07
Día 15, antes de la dosis	0,902	0,382
Día 15, hora 1	17,91	33,08
Día 22, antes de la dosis	1,065	0,595
Día 22, hora 1	19,41	33,00
Día 1, hora 672	1,202	0,362

TABLA 28

Concentraciones séricas ($\mu\text{g/ml}$) de anti-EGFR en suero de mono cynomolgus tras la administración intravenosa de 4,5 mg/kg de anti-EGFR en los días 1, 8, 15 y 22		
Punto temporal	Número del animal	
	2M461	2F462
Día 1, hora 1	32,45	29,51
Día 1, hora 4	32,39	29,57
Día 1, hora 12	28,05	25,88
Día 1, hora 24	23,70	23,78
Día 1, hora 72	14,03	14,38
Día 1, hora 120	10,42	8,137
Día 8, antes de la dosis	4,672	3,683
Día 8, hora 1	25,91	31,06
Día 15, antes de la dosis	5,572	5,450
Día 15, hora 1	32,20	35,38
Día 22, antes de la dosis	BLQ	6,497
Día 22, hora 1	26,98	30,23
Día 1, hora 672	BLQ	4,845

5

TABLA 29

Concentraciones séricas ($\mu\text{g/ml}$) de anti-EGFR en suero de mono cynomolgus tras la administración intravenosa de 12 mg/kg de anti-EGFR en los días 1, 8, 15 y 22		
Punto temporal	Número del animal	
	1M623	1F590
Día 1, hora 1	262,2	168,0
Día 1, hora 4	223,3	174,5
Día 1, hora 12	164,9	165,7
Día 1, hora 24	141,7	146,0
Día 1, hora 72	99,54	86,64
Día 1, hora 120	86,64	69,08
Día 8, antes de la dosis	65,86	45,21
Día 8, hora 1	282,1	209,9
Día 15, antes de la dosis	98,43	71,21
Día 15, hora 1	385,9	231,4
Día 22, antes de la dosis	117,3	105,6
Día 22, hora 1	234,1	402,5
Día 1, hora 672	127,5	122,9

TABLA 30

Parámetros farmacocinéticos del anti-EGFR el día 1 de la administración intravenosa semanal de anti-EGFR a los monos cynomolguss									
Dosis	Animal	C _{max}	T _{max} (h)	AUC _t	AUC	CL	V _{ss}	K	T _{1/2}
1,5	1M623	33,42	1	830,4	849,4	1,778	60,79	0,0214	32,5
1,5	1F590	30,86	1	748,4	774,9 ^a	1,962 ^a	57,85 ^a	0,0105 ^a	66,0 ^a
4,5	2M461	32,45	1	2537	3005	1,488	133,6	0,0110	63,1
4,5	2F462	29,57	4	2378	2719	1,663	133,2	0,0121	57,4
12	3M463	262,2	1	18310	29870 ^a	0,4058 ^a	71,33 ^a	0,0056 ^a	124,3 ^a
12	3F612	174,5	4	15980	21400 ^a	0,5552 ^a	66,94 ^a	0,0082 ^a	84,4 ^a
^a Estos valores son estimaciones debido a que los datos no cumplieron todos los criterios definidos en el procesamiento de los datos y, por tanto, deben ser tratados con precaución									

5 Hematología y bioquímica sanguínea

Las muestras de sangre se tomaron desde la vena femoral de monos cynomolguss a los que se administró una inyección intravenosa en bolo del GlycomAb anti-EGFR los días 1, 8, 15, y 22. Las muestras se tomaron del brazo que no se utilizó para la administración de la dosis, después de la privación de comida durante la noche (no fallecidos). Las muestras se examinaron antes del tratamiento, tres días después de la segunda dosis y al finalizar para evaluar los siguientes parámetros, utilizando heparina de litio como anticoagulante

10 Fosfatasa alcalina
 15 Alanina aminotransferasa
 Aspartato aminotransferasa
 Bilirrubina – total
 Urea
 Creatinina
 Glucosa
 20 Colesterol – total
 Triglicéridos
 Sodio
 Potasio
 Cloro
 25 Calcio
 Fósforo
 Proteínas totales
 Electroforetograma proteico
 30 Proporción de albúmina/globulina

Los datos normales promedio del análisis de la bioquímica sanguínea de los monos cynomolguss se muestran en la TABLA 31.

TABLA 31

Bioquímica sanguínea de monos cynomolguss (originarios de las Islas Mauricio)									
Parámetro	Sexo	n	1%	5%	50%	95%	99%	Media	SD
ALP	M	949	837	1339	2147	3201	3899	2175,5	565,44
	F	881	946	1342	2144	3163	3740	2164,1	552,82
ALP-N	M	511	481	579	881	1453	1771	928,0	260,88

ES 2 424 388 T3

Bioquímica sanguínea de monos cynomolgus (originarios de las Islas Mauricio)									
Parámetro	Sexo	n	1%	5%	50%	95%	99%	Media	SD
	F	499	427	546	846	1362	1694	879,5	240,24
ALT	M	1489	24	30	50	87	127	53,7	19,07
	F	1407	23	28	46	84	111	49,3	18,65
AST	M	1487	26	30	41	63	101	43,6	17,57
	F	1404	25	29	39	61	89	41,7	13,59
gGT	M	663	95	118	178	292	342	188,5	52,47
	F	641	81	102	153	232	266	158,6	38,38
FAL	M	207	18	26	40	79	217	45,1	28,25
	F	205	15	20	35	62	89	37,1	12,73
GLDH	M	159	8	10	17	35	126	20,1	16,46
	F	159	6	8	15	27	35	16,3	5,97
Bilirrubina	M	1494	1	1	3	8	11	3,8	2,04
	F	1413	1	2	4	8	11	4,1	2,07
LDH	M	99	160	596	808	1166	2029	838,3	218,75
	F	82	477	529	711	945	1021	715,0	117,07
CPK	M	331	68	83	179	713	1867	287,4	464,03
	F	335	57	77	184	925	2628	309,7	534,02
Bil. indirecta	M	59	1	2	4	10	11	4,2	2,15
	F	57	1	2	4	5	7	3,6	1,13
Bil. directa	M	59	0	0	0	2	3	0,2	0,65
	F	57	0	0	0	1	3	0,2	0,52
Ácidos Biliares	M	386	0,9	2,5	6,4	15,3	23,4	7,38	4,574
	F	380	1,4	3,0	7,0	12,9	17,8	7,41	3,474
Urea	M	1457	3,01	3,66	5,50	8,81	10,53	5,775	1,5710
	F	1379	2,77	3,42	5,33	8,56	9,90	5,559	1,5432
Creatinina	M	1458	55	59	71	87	94	71,6	8,67
	F	1383	56	60	72	87	85	72,7	8,36
Glucosa	M	1455	2,22	2,64	3,71	5,21	6,37	3,809	0,8135
	F	1380	2,23	2,65	3,63	5,18	6,34	3,735	0,7990
Colesterol	M	1455	1,69	1,93	2,68	3,55	3,96	2,706	1,4909
	F	1382	1,83	2,15	2,86	3,69	4,05	2,885	0,4813
Col. HDL	M	45	1,26	1,34	1,79	2,23	2,59	1,784	0,3128
	F	45	1,09	1,31	1,82	2,43	2,55	1,844	0,3179
Col. VLDL	M	45	0,00	0,00	0,00	0,03	0,11	0,004	0,0175
	F	45	0,00	0,00	0,00	0,12	0,19	0,012	0,0370
Ácidos grasos no esenciales	M	132	0,10	0,28	0,98	1,84	2,44	0,994	0,4700
	F	132	0,14	0,22	1,06	1,90	2,18	1,070	0,4704
Triglicéridos	M	1453	0,26	0,32	0,53	0,86	1,30	0,561	0,2051

Bioquímica sanguínea de monos cynomolgus (originarios de las Islas Mauricio)									
Parámetro	Sexo	n	1%	5%	50%	95%	99%	Media	SD
pH lipídico	F	1374	0,26	0,34	0,57	0,90	1,14	0,587	0,1778
	M	64	1,65	1,68	2,18	2,91	3,15	2,254	0,3769
Ácido úrico	F	49	1,77	1,83	2,44	2,91	2,98	2,405	0,3267
	M	17	0	0	0	8	8	1,1	2,34
Na	F	17	0	0	0	1	1	0,4	0,51
	M	1461	141	142	147	152	155	146,8	3,00
K	F	1382	140	142	147	153	157	147,3	3,34
	M	1460	3,2	3,4	4,0	5,0	5,6	4,08	0,511
Cl	F	1382	3,2	3,3	4,0	4,9	5,4	4,01	0,484
	M	1461	102	104	108	112	115	107,7	2,71
Ca	F	1382	102	104	108	113	116	108,4	2,83
	M	1462	2,31	2,39	2,57	2,77	2,584	2,568	0,1176
Fósforo	F	1382	2,32	2,39	2,57	2,77	2,89	2,572	0,1168
	M	1172	1,16	1,40	1,93	2,43	2,69	1,921	0,3126
Col. LDL	F	1098	1,17	1,37	1,84	2,35	2,60	1,844	0,2978
	M	45	0,54	0,62	1,20	1,87	1,92	1,253	0,3694
Bicarbonato	F	45	0,69	0,78	1,19	1,83	1,88	1,233	0,2906
	M	288	7	10	17	22	25	16,5	3,51
Proteínas totales	F	283	6	10	16	22	25	15,9	3,81
	M	1455	71	47	80	87	90	80,2	4,06
Albúmina (bioquímica)	F	1381	71	47	81	89	92	81,2	4,32
	M	346	34	38	43	46	49	42,6	2,67
Albúmina	F	342	36	38	43	47	49	42,7	2,60
	M	1089	33	36	45	51	54	44,3	4,46
Globulina	F	1019	34	37	45	52	55	44,7	4,58
	M	289	31	32	36	41	45	36,3	2,83
Proporción A/G (bioquímica)	F	285	30	32	37	43	48	37,5	3,59
	M	340	0,79	0,98	1,17	1,39	1,45	1,172	0,1215
Proporción A/G	F	336	0,84	0,95	1,14	1,34	1,42	1,143	0,1274
	M	1068	0,68	0,80	1,26	1,65	1,82	1,252	0,2522
Globulina A1	F	998	0,67	0,79	1,26	1,66	1,81	1,247	0,2647
	M	1105	2	2	3	4	4	2,8	0,62
Globulina A2	F	1035	2	2	3	4	5	2,8	0,64
	M	1105	3	3	4	6	7	4,2	0,92
Globulina beta	F	1035	3	3	4	6	7	4,2	1,01
	M	1105	12	13	16	22	24	16,6	2,63
Globulina gamma	F	1035	12	13	16	22	25	16,8	2,85
	M	1105	8	9	12	17	18	12,6	2,26

Bioquímica sanguínea de monos cynomolguss (originarios de las Islas Mauricio)									
Parámetro	Sexo	n	1%	5%	50%	95%	99%	Media	SD
	F	1035	8	9	13	17	20	13,1	2,52
Aldolasa	M	96	9	14	21	38	57	22,0	7,48
	F	97	10	13	19	48	84	21,9	11,91
Colinesterasa plasmática	M	17	4159	4159	5745	9160	9160	5919,8	1181,68
	F	17	3371	3371	5869	8367	8367	5689,2	1512,98
PCR	M	57	0,000	0,000	0,002	0,013	0,026	0,0032	0,00414
	F	56	0,000	0,000	0,002	0,004	0,007	0,0017	0,00167
T3	M	40	1,90	1,90	2,50	3,38	3,58	2,537	0,4011
	F	40	1,71	1,96	2,59	3,06	4,02	2,631	0,3799
T4	M	40	35	42	59	86	92	59,7	11,84
	F	40	38	40	56	81	107	58,6	14,37

Las muestras para el análisis hematológico de la sangre periférica se tomaron de la vena femoral de monos cynomolguss a los que se administró una inyección intravenosa en bolo del GlycomAb anti-EGFR los días 1, 8, 15, y 22. Las muestras se tomaron del brazo que no se utilizó para la administración de la dosis, después de la privación de comida durante la noche (no fallecidos). Las muestras se examinaron antes del tratamiento, tres días después de la segunda dosis y al finalizar para evaluar los siguientes parámetros:

1) Utilizando EDTA como anticoagulante.

- 10 Hematocrito
- Concentración de hemoglobina
- Recuento eritrocitario
- Reticulocitos
- Hemoglobina celular media
- 15 Concentración de hemoglobina celular media
- Volumen celular medio
- Recuento leucocitario medio
- Recuento leucocitario diferencial
- Recuento plaquetario
- 20 Anormalidades morfológicas sanguíneas
- Anisocitosis
- Microcitosis
- Macrocitosis
- Hipocromía
- 25 Hiperchromía

2) Utilizando citrato como anticoagulante.

- 30 Tiempo de protrombina
- Tiempo de tromboplastina parcial activada

Los datos normales promedio del análisis hematológico de los monos cynomolguss se muestran en la TABLA 32.

TABLA 32

Hematología de monos cynomolguss (originarios de las Islas Mauricio)									
Parámetro	Sexo	n	1%	5%	50%	95%	99%	Media	SD
Hematocrito	M	1495	0,385	0,401	0,443	0,488	0,512	0,4435	0,02776
	F	1426	0,376	0,399	0,442	0,489	0,508	0,4424	0,02947
Hemoglobina	M	1495	11,4	12,1	13,3	14,5	15,1	13,31	0,769

ES 2 424 388 T3

Hematología de monos cynomolgus (originarios de las Islas Mauricio)									
	F	1426	11,2	11,9	13,2	14,5	15,1	13,21	0,855
Eritrocitos	M	1495	5,67	6,04	6,74	7,51	7,92	6,744	0,4792
	F	1426	5,58	5,96	6,71	7,45	7,73	6,707	0,4894
Reticulocitos (1) %	M	20	0,1	0,1	0,4	1,8	1,8	0,48	0,438
	F	20	0,1	0,1	0,3	0,9	0,9	0,42	0,268
Reticulocitos (2) %	M	1476	0,21	0,27	0,49	0,95	1,58	0,551	0,3804
	F	1408	0,22	0,28	0,54	1,06	1,60	0,595	0,2934
HCM	M	1495	17,0	17,8	19,8	21,6	22,5	19,80	1,432
	F	1425	16,7	17,7	19,7	21,8	22,6	19,74	1,216
CHCM	M	1495	27,2	28,2	30,1	31,9	32,7	30,06	1,801
	F	1425	27,0	27,9	29,9	31,8	32,6	29,88	1,174
VCM	M	1495	57,9	60,5	65,8	71,4	73,5	65,88	3,278
	F	1425	58,3	60,4	66,0	71,7	74,5	66,07	3,353
Distribución de volumen (RDW)	M	280	12,6	12,9	14,4	16,1	16,7	14,40	0,934
	F	285	12,4	12,8	14,2	15,7	16,3	14,21	0,879
Leucocitos	M	1507	5,61	6,62	10,52	18,59	30,24	11,372	4,7766
	F	1432	5,39	6,58	10,62	19,55	28,79	11,637	4,7307
Neutrófilos	M	1507	0,88	1,28	3,49	10,24	16,27	4,319	3,1741
	F	1432	1,06	1,62	4,45	12,27	17,41	5,392	3,4777
Linfocitos	M	1507	2,19	2,96	5,53	9,81	15,91	6,021	3,4066
	F	1432	2,16	2,67	4,86	8,55	13,95	5,265	2,9997
Eosinófilos	M	1507	0,00	0,01	0,17	0,81	1,49	0,254	0,3127
	F	1432	0,00	0,01	0,14	0,73	1,55	0,232	0,3188
Basófilos	M	1507	0,01	0,02	0,04	0,10	0,25	0,053	0,0627
	F	1432	0,01	0,02	0,04	0,10	0,21	0,051	0,0540
Monocitos	M	1507	0,17	0,25	0,51	1,03	1,45	0,562	0,2575
	F	1432	0,16	0,23	0,49	1,04	1,56	0,547	0,2705
Células grandes no teñidas (LUC)	M	1507	0,04	0,06	0,14	0,32	0,60	0,163	0,1330
	F	1432	0,04	0,06	0,13	0,29	0,50	0,148	0,1147
Plaquetas	M	1495	158	238	359	497	575	362,1	81,69
	F	1426	181	234	359	496	560	360,5	80,04
TP	M	1481	9,6	9,9	10,8	12,0	14,8	10,88	0,877
	F	1406	9,7	10,0	10,8	12,1	14,1	10,93	0,847
TTPA	M	1483	23,1	24,4	29,1	37,9	50,1	30,06	5,267
	F	1408	22,8	24,4	29,4	37,4	47,2	30,39	5,185
Fibrinógeno	M	265	1,61	1,86	2,61	3,51	4,88	2,664	0,6178
	F	252	1,58	1,84	2,43	3,27	3,89	2,487	0,4545

Los valores bioquímicos individuales acumulados de los monos se muestran en las TABLAS 33a-h, a continuación:

TABLA 33^a

Número de animal	Grupo/ Sexo	Código occn.	ALP U/l	ALT U/l	AST U/l	Bili. μ mol/l	Urea mmol/l	Creat. μ mol/l	Gluc. mmol/l	Col. mmol/l
615	1M	PT	740	36	39	3	5,35	69	3,65	2,34
		D11	743	35	33	3	5,43	73	3,66	2,00
		TERM	597	29	31	2	5,16	76	3,74	2,30
465	2M	PT	647	44	33	3	5,73	70	4,69	2,50
		PD	755	47	36	2	3,60	73	4,50	2,72
		D11	655	74	46	5	4,34	74	3,35	2,64
		TERM	768	48	38	3	4,42	73	3,67	2,54
639	2M	PD	741	29	26	2	4,41	87	3,31	3,22
		D11	629	29	28	3	3,87	99	2,64	2,99
		TERM	599	34	22	2	3,62	83	3,46	2,45
613	3M	PT	1003	37	31	5	3,80	90	5,72	2,61
		D11	793	36	29	4	4,45	80	3,28	2,70
		TERM	93	34	32	5	5,16	83	2,78	2,46
631	4M	PD	590	34	37	2	3,43	83	3,92	2,49
		D11	508	38	36	3	3,33	82	3,38	2,30
		TERM	578	25	25	2	4,00	89	3,70	2,26

TABLA 33b

Número de animal	Grupo/ Sexo	Código occn.	Trig. Mmol/l	Na mmol/l	K mmol/l	Cl mmol/l	Ca mmol/l	Fósforo mmol/l	Proteínas totales	Alb. g/l
615	1M	PT	0,24	146	4,7	108	2,54	1,77	91	35
		D11	0,39	145	3,9	106	2,55	1,85	94	41
		TERM	0,34	147	4,2	107	2,47	1,63	87	38
465	2M	PT	0,74	147	3,7	108	2,71	1,32	81	37
		PD	0,93	147	4,1	109	2,70	1,54	84	46
		D11	0,66	151	3,9	111	2,70	1,98	83	39
		TERM	0,51	146	3,6	105	2,67	1,85	80	40
639	2M	PD	0,27	146	4,2	107	2,68	1,85	84	44
		D11	0,32	150	4,8	108	2,81	2,07	85	42
		TERM	0,38	146	4,5	107	2,70	2,03	74	39
613	3M	PT	0,47	151	4,5	106	2,75	1,85	83	41
		D11	0,44	147	4,2	106	2,69	1,76	80	45
		TERM	0,69	147	4,3	106	2,63	1,62	76	40
631	4M	PD	0,45	149	4,2	107	2,67	2,00	87	46
		D11	0,77	151	5,0	112	2,68	2,00	84	39
		TERM	0,64	150	4,7	107	2,77	1,89	86	46

TABLA 33c

Número de animal	Grupo/ Sexo	Código occn.	a1 g/l	a2 g/l	Beta g/l	Gamma g/l	Propor. A/G	Alb. %	a1 %	a2 %
615	1M	PT	3	5	25	23	0,63	39,0	3,4	5,1
		D11	3	4	22	25	0,77	43,1	3,0	4,5
		TERM	3	4	21	21	0,78	43,5	3,3	4,9
465	2M	PT	4	5	22	13	0,84	45,7	4,5	5,9
		PD	3	4	18	12	1,21	54,9	3,6	5,0
		D11	4	5	20	15	0,89	46,7	4,9	6,4
		TERM	3	5	20	11	1,00	50,5	4,0	5,8
639	2M	PD	3	5	17	14	1,10	52,9	3,5	5,8
		D11	3	6	18	16	0,98	49,1	4,1	6,6
		TERM	3	4	17	11	1,11	52,2	3,7	6,0
613	3M	PT	4	4	20	14	0,98	49,5	5,0	4,7
		D11	3	3	17	13	1,29	55,8	3,7	3,7
		TERM	3	3	15	14	1,11	53,0	4,6	3,9
631	4M	PD	3	4	18	16	1,12	53,3	3,6	4,3
		D11	4	4	19	18	0,87	46,4	4,4	4,4
		TERM	3	4	19	15	1,15	53,1	3,4	4,3

5

TABLA 33d

Número de animal	Grupo/ Sexo	Código occn.	Beta %	Gamma %
615	1M	PT	27,3	25,3
		D11	23,2	26,2
		TERM	24,4	23,9
465	2M	PT	27,4	16,6
		PD	21,8	14,7
		D11	21,0	17,9
		TERM	25,5	14,2
639	2M	PD	20,7	17,0
		D11	21,5	18,7
		TERM	23,2	14,9
613	3M	PT	24,5	16,3
		D11	21,0	15,8
		TERM	20,0	18,5
631	4M	PD	20,7	18,0

Número de animal	Grupo/ Sexo	Código occn.	Beta %	Gamma %
		D11	22,8	22,0
		TERM	22,1	17,1

TABLA 33e

Número de animal	Grupo/ Sexo	Código occn.	ALP U/l	ALT U/l	AST U/l	Bili. µmol/l	Urea mmol/l	Creat. µmol/l	Gluc. mmol/l	Col. mmol/l
614	1F	PT	687	71	50	3	4,92	60	4,45	2,77
		D11	576	63	44	2	5,22	63	4,32	2,73
		TERM	517	59	41	3	4,78	70	3,98	2,83
653	1F	PT	598	43	25	3	7,26	69	3,26	2,42
		D11	540	40	28	3	6,94	78	3,28	2,46
		TERM	511	40	27	4	6,78	80	3,46	2,38
624	2F	PD	533	56	35	3	3,85	73	3,91	2,31
		D11	410	40	34	13	4,18	78	2,72	2,56
		TERM	432	41	25	3	3,70	78	3,30	2,16
632	3F	PT	559	35	34	5	5,44	80	3,08	2,47
		D11	510	37	31	5	4,36	85	3,89	2,61
		TERM	428	37	34	5	5,32	88	3,10	2,63
640	4F	PD	343	23	32	4	4,09	65	3,46	1,24
		D11	292	25	28	4	4,12	63	2,69	1,13
		TERM	266	22	27	2	4,55	69	3,69	1,00

5

TABLA 33f

Número de animal	Grupo/ Sexo	Código occn.	Trig. Mmol/l	Na mmol/l	K mmol/l	Cl mmol/l	Ca mmol/l	Fósforo mmol/l	Proteínas totales	Alb. g/l
614	1F	PT	0,37	148	4,6	109	2,69	2,03	80	39
		D11	0,33	147	4,1	109	2,72	2,08	82	43
		TERM	0,54	148	3,6	108	2,59	1,84	80	41
653	1F	PT	0,57	147	4,3	105	2,58	1,52	78	35
		D11	0,43	149	4,7	108	2,74	1,80	88	43
		TERM	0,59	149	4,4	108	2,59	1,51	80	40
624	2F	PD	0,60	145	4,1	108	2,54	1,50	77	40
		D11	0,51	148	4,0	111	2,58	1,42	77	39
		TERM	0,43	146	3,9	108	2,56	1,46	76	44
632	3F	PT	0,31	151	4,5	109	2,48	1,72	76	34
		D11	0,34	149	4,6	109	2,58	1,85	80	39
		TERM	0,49	150	4,5	111	2,55	1,47	78	38

Número de animal	Grupo/ Sexo	Código occn.	Trig. Mmol/l	Na mmol/l	K mmol/l	Cl mmol/l	Ca mmol/l	Fósforo mmol/l	Proteínas totales	Alb. g/l
640	4F	PD	0,63	144	4,8	111	2,31	1,45	68	29
		D11	0,31	145	4,3	112	2,24	1,53	63	25
		TERM	0,27	144	4,7	108	2,20	1,33	60	25

TABLA 33g

Número de animal	Grupo/ Sexo	Código occn.	a1 g/l	a2 g/l	Beta g/l	Gamma g/l	Propor. A/G	Alb. %	a1 %	a2 %
614	1F	PT	4	5	20	13	0,95	49,2	4,4	5,9
		D11	3	4	19	13	1,10	52,7	3,3	4,9
		TERM	3	4	18	13	1,05	51,7	3,8	5,2
653	1F	PT	4	5	19	15	0,81	45,1	4,6	5,9
		D11	3	5	20	17	0,96	49,3	3,4	5,5
		TERM	4	5	18	14	1,00	49,4	4,7	6,2
624	2F	PD	3	4	16	14	1,08	52,2	4,1	5,4
		D11	4	4	17	14	1,03	50,1	4,9	5,5
		TERM	3	4	15	10	1,38	58,5	3,4	5,3
632	3F	PT	4	4	19	15	0,81	44,7	5,1	5,0
		D11	3	4	17	16	0,95	49,2	4,2	4,7
		TERM	4	4	17	15	0,95	49,2	4,6	4,9
640	4F	PD	4	4	17	15	0,74	42,2	5,7	5,6
		D11	4	3	17	13	0,66	40,1	6,6	5,5
		TERM	4	3	16	13	0,71	41,4	6,4	4,6

5

TABLA 33h

Número de animal	Grupo/ Sexo	Código occn.	Beta %	Gamma %
614	1F	PT	24,8	15,7
		D11	23,1	16,0
		TERM	22,8	16,5
653	1F	PT	24,7	19,7
		D11	22,3	19,4
		TERM	22,1	17,6
624	2F	PD	20,7	17,6
		D11	21,6	18,0
		TERM	19,9	12,9
632	3F	PT	24,9	20,2

Número de animal	Grupo/ Sexo	Código occn.	Beta %	Gamma %
640	4F	D11	21,5	20,4
		TERM	21,8	19,5
		PD	24,9	21,6
		D11	26,9	20,9
		TERM	26,5	21,1

Los valores hematológicos individuales acumulativos de los monos se muestran en la TABLA 34a-I, a continuación:

TABLA 34^a

5

Número de animal	Grupo/ Sexo	Código occn.	Hct. l/l	Hb g/dl	Eritr. x10 ¹² /l	Reticulocitos %	HCM pg	CHCM g/dl	VCM fl
615	1M	PT	0,389	12,4	5,94	0,38	20,9	31,9	65,5
		D11	0,366	11,5	5,59	0,76	20,6	31,4	65,5
		TERM	0,381	11,8	5,91	0,25	20,0	31,0	64,5
465	2M	PT PTR	0,439	13,2	6,76	0,56	19,5	30,1	65,0
		PD	0,460	13,7	7,22	0,50	19,0	29,9	63,8
		D11	0,392	11,7	6,11	1,62	19,1	29,9	64,0
		TERM	0,441	13,6	6,93	0,65	19,7	30,9	63,7
639	2M	PD	0,419	12,7	6,23	0,57	20,4	30,3	67,2
		D11	0,400	11,7	5,99	0,52	19,6	29,3	66,7
		TERM	0,388	12,2	5,70	1,14	21,4	31,4	68,1
613	3M	PT PTR	0,461	14,1	6,79	0,48	20,7	30,5	67,8
		D11	0,396	12,7	6,05	0,92	21,0	32,1	65,4
		TERM	0,410	12,9	6,23	0,49	20,8	31,5	65,9

TABLA 34b

Número de animal	Grupo / Sexo	Código occn.	Leucocitos x10 ⁹ /l	N x10 ⁹ /l	L x10 ⁹ /l	E x10 ⁹ /l	Basófilos x10 ⁻⁹ /l	Monocitos x10 ⁻⁹ /l	LUC x10 ⁹ /l	Plaquetas x10 ⁹ /l
615	1M	PT	7,57	3,06	3,68	0,06	0,03	0,53	0,20	236
		D11	7,56	2,78	4,35	0,06	0,02	0,21	0,13	284
		TERM	7,93	3,77	3,52	0,06	0,02	0,49	0,07	254
465	2M	PT	14,19	1,78	10,37	1,24	0,05	0,55	0,20	302
		PTR	13,69	3,69	8,25	0,93	0,04	0,47	0,29	
		PD	13,36	1,55	9,95	1,01	0,04	0,58	0,25	325
		D11	12,26	4,70	5,63	1,27	0,04	0,51	0,11	403
		TERM	15,45	1,54	11,57	1,65	0,07	0,42	0,20	356
639	2M	PD	10,02	5,21	3,42	0,90	0,01	0,39	0,10	306

Número de animal	Grupo / Sexo	Código occn.	Leucocitos x10 ⁹ /l	N x10 ⁹ /l	L x10 ⁹ /l	E x10 ⁹ /l	Basófilos x10 ⁻⁹ /l	Monocitos x10 ⁻⁹ /l	LUC x10 ⁹ /l	Plaquetas x10 ⁹ /l
613	3M	D11	8,26	4,06	2,47	1,17	0,01	0,45	0,10	371
		TERM	8,70	2,55	4,20	1,04	0,02	0,80	0,09	253
		PT	20,21	12,99	6,45	0,02	0,04	0,50	0,21	438
		PTR	16,85	8,87	6,90	0,08	0,06	0,67	0,26	
		D11	10,85	6,11	4,15	0,03	0,02	0,41	0,32	441
		TERM	23,23	17,70	4,27	0,05	0,04	1,11	0,08	434

TABLA 34c

Número de animal	Grupo/ Sexo	Código occn.	TP s.	TTPA s
615	1M	PT	11,3	37,3
		D11	10,3	32,7
		TERM	11,3	33,3
465	2M	PT	10,0	33,9
		PTR		
		PD	9,9	26,1
		D11	10,0	31,6
		TERM	10,2	29,4
639	2M	PD	10,6	22,6
		D11	10,5	26,3
		TERM	10,3	28,9
613	3M	PT	10,3	35,5
		PTR		
		D11	11,4	26,7
		TERM	10,3	30,8

5

TABLA 34d

Número de animal	Grupo/ Sexo	Código occn.	Anisocitosis	Microcitosis	Macrocitosis	Hipocromía	Hipercromía
615	1M	PT	-	-	-	-	+
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	+
465	2M	PT PTR	-	-	-	-	-
		PD	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-
639	2M	PD	-	-	-	-	-

Número de animal	Grupo/ Sexo	Código occn.	Anisocitosis	Microcitosis	Macrocitosis	Hipocromía	Hipercromía
613	3M	D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-
		PT PTR	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	+
		TERM	-	-	-	-	-

TABLA 34e

Número de animal	Grupo/ Sexo	Código occn.	Hct. l/l	Hb g/dl	Eritr. x10 ¹² /l	Reticulocitos %	HCM pg	CHCM g/dl	VCM fl
631	4M	PT	0,460	13,6	7,11	0,43	19,1	29,5	64,6
		D11	0,395	11,9	6,36	0,45	18,7	30,2	62,1
		TERM	0,449	13,7	6,97	0,30	19,6	30,5	64,4
614	1F	PT PTR	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD
		D11	0,404	13,1	6,33	0,57	20,6	32,3	63,8
		TERM	0,424	13,0	6,59	0,68	19,7	30,7	64,3
652	1F	PT	0,390	11,3	5,72	1,15	19,8	29,1	68,2
		D11	0,374	11,9	5,55	1,06	21,4	31,7	67,4
		TERM	0,385	11,5	5,71	0,58	20,2	30,0	67,2
624	2F	PD	0,407	11,8	7,14	0,73	16,6	29,0	57,11
		D11	0,377	10,8	6,69	0,48	16,1	28,6	56,3
		TERM	0,401	11,7	6,99	1,07	16,7	29,1	57,4

5

TABLA 34f

Número de animal	Grupo / Sexo	Código occn.	Leucocitos x10 ⁹ /l	N x10 ⁹ /l	L x10 ⁹ /l	E x10 ⁹ /l	Basófilos x10 ⁻⁹ /l	Monocitos x10 ⁻⁹ /l	LUC x10 ⁹ /l	Plaquetas x10 ⁹ /l
631	4M	PD	10,53	2,82	6,36	0,62	0,02	0,58	0,13	378
		D11	7,97	2,86	3,81	0,61	0,01	0,53	0,16	424
		TERM	8,08	1,73	5,04	0,63	0,02	0,60	0,05	384
614	1F	PT	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD
		PTR	11,32	3,47	6,36	0,17	0,05	0,96	0,31	
		D11	9,70	4,74	3,73	0,09	0,02	0,84	0,28	429
		TERM	9,64	3,65	5,09	0,13	0,01	0,62	0,13	414
652	1F	PT	10,66	3,21	6,05	0,42	0,03	0,80	0,15	373
		D11	12,01	5,53	5,20	0,34	0,02	0,78	0,13	380
		TERM	11,88	7,59	3,24	0,35	0,02	0,61	0,08	338
624	2F	PD	9,06	3,10	5,02	0,41	0,02	0,33	0,18	362
		D11	7,82	5,14	2,06	0,14	0,02	0,34	0,13	353

Número de animal	Grupo / Sexo	Código occn.	Leucocitos x10 ⁹ /l	N x10 ⁹ /l	L x10 ⁹ /l	E x10 ⁹ /l	Basófilos x10 ⁻⁹ /l	Monocitos x10 ⁻⁹ /l	LUC x10 ⁹ /l	Plaquetas x10 ⁹ /l
		TERM	11,69	4,33	5,46	0,96	0,02	0,76	0,16	426

TABLA 34g

Número de animal	Grupo/ Sexo	Código occn.	TP	TTPA
631	4M	PD	10,9	29,3
		D11	11,3	27,9
		TERM	10,8	32,1
614	1F	PT	CTD	CTD
		PTR		
		D11	10,2	32,1
652	1F	TERM	10,5	29,3
		PT	10,2	33,0
		D11	9,6	27,9
624	2F	TERM	10,3	30,3
		PD	10,6	27,1
		D11	10,6	29,7
		TERM	10,8	33,3

5

TABLA 34h

Número de animal	Grupo/ Sexo	Código occn.	Anisocitosis	Microcitosis	Macrocitosis	Hipocromía	Hipercromía
631	4M	PD	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-
614	1F	PT PTR	CTD	CTD	CTD	CTD	CTD
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-
652	1F	PT	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-
624	2F	PD	-	+	-	-	-
		D11	-	+	-	-	-
		TERM	+	+			

TABLA 34i

Número de animal	Grupo/ Sexo	Código occn.	Hct. l/l	Hb g/dl	Eritr. x10 ¹² /l	Reticulocitos %	HCM pg	CHCM g/dl	VCM fl
632	3F	PT	0,416	12,4	6,36	0,83	19,6	29,9	65,4
		PTR	0,410	12,2	6,29	0,64	19,5	29,8	65,3
		D11	0,392	12,2	6,19	0,73	19,7	31,0	63,4
		TERM	0,412	12,3	6,46	0,55	19,1	29,9	63,8
640	4F	PD	0,398	11,8	5,81	0,95	20,3	29,7	68,5
		D11	0,369	11,0	5,30	1,17	20,7	29,8	69,6
		TERM	0,401	11,9	5,58	0,83	21,3	29,6	71,9

5

TABLA 34j

Número	Grupo	Código	Leucocitos	N	L	E	Basófilos	Monocitos	LUC	Plaquetas
632	3F	PT	18,12	10,58	5,61	1,07	0,04	0,61	0,21	335
		PTR	15,16	5,99	7,24	0,95	0,03	0,63	0,31	308
		D11	10,23	4,69	4,15	0,66	0,01	0,48	0,23	348
		TERM	13,04	6,89	4,62	0,44	0,03	0,93	0,13	321
640	4F	PD	12,49	8,29	2,91	0,46	0,02	0,64	0,17	567
		D11	13,71	10,31	2,18	0,34	0,01	0,74	0,12	578
		TERM	11,49	5,41	4,18	0,63	0,03	1,12	0,12	555

TABLA 34k

Número de animal	Grupo/ Sexo	Código occn.	TP s.	TTPA s
632	3F	PT	10,6	47,8
		PTR	10,6	44,7
		D11	10,2	33,1
		TERM	10,6	37,2
640	4F	PD	12,0	35,8
		D11	12,4	28,0
		TERM	12,8	30,1

10

TABLA 34l

Número de animal	Grupo/ Sexo	Código occn.	Anisocitosis	Microcitosis	Macrocitosis	Hipocromía	Hipercromía
632	3F	PT	-	-	-	-	-
		PTR	-	-	-	-	-

		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-
640	4F	PD	-	-	-	-	-
		D11	-	-	-	-	-
		TERM	-	-	-	-	-

Patología microscópica – Hallazgos relacionados con el tratamiento

La pericolangitis (una inflamación del tejido conjuntivo que rodea el conducto biliar) se describió en las hembras de mono que recibieron la dosis de 12 mg/kg/día, pero no se observó en ninguna otra hembra o macho de mono. El hallazgo puede estar relacionado con el tratamiento con Glyco-mAb (anti-EGFR), pero con un número tan pequeño de animales la significación es incierta. El resto de hallazgos se consideraron incidentales y sin significación toxicológica.

Macropatología e histopatología

El resumen de la histopatología de todos los animales evaluados se muestra en la TABLA 35, a continuación:

TABLA 35

Histopatología – distribución en grupos y gravedad de los hallazgos en todos los animales							
Grupo	1	2			3		
Compuesto	Glico-mAb (anti-EGFR)						
Dosis	1,5	4,5			12		
		Número de animales afectados					
	Sexo	Macho			Hembra		
	Grupo	1	2	3	1	2	3
Órgano/tejido examinado	Número	1	1	1	1	1	1
Colon	Nº de examinados	1	1	1	1	1	1
Corazón	Nº de examinados	1	1	1	1	1	1
Riñones	Nº de examinados	1	1	1	1	1	1
Infiltración linfocítica cortical	Mínima	1	1	0	0	1	1
	Leve	0	0	0	1	0	[?]
	Total	1	1	0	1	1	1
Cefálica izquierda	Nº de examinados	0	0	0	0	0	0
		Número de animales afectados					
	Sexo	Macho			Hembra		
	Grupo	1	2	3	1	2	3
Órgano/tejido examinado	Número	1	1	1	1	1	1
Safena izquierda - Hiperplasia epidérmica	Nº de examinados	1	1	1	1	1	1
	Mínima	0	0	0	1	0	0
	Total	0	0	0	1	0	0
Hígado - Focos celulares inflamatorios	Nº de examinados	1	1	1	1	1	1
	Mínima	1	1	1	1	1	1
	Total	1	1	1	1	1	1

- Proliferación ductal biliar	Mínima	0	0	0	0	0	1
	Total	0	0	0	0	0	1
- Vacuolización de hepatocitos – Hendidura media	Mínima	0	1	0	0	0	0
	Total	0	1	0	0	0	0
Pericolangitis	Mínima	0	0	0	0	0	1
	Total	0	0	0	0	0	1
Pulmones y bronquios	Nº de examinados	1	1	1	1	1	1
- Bronquios/bronquiolos – Células inflamatorias mucosas/submucosas	Leve	1	0	0	0	0	0
	Total	1	0	0	0	0	0
- Macrófagos alveolares	Mínimos	0	1	0	0	0	1
	Total	0	1	0	0	0	1
- Células inflamatorias/linfoides perivasculares	Mínimos	0	0	1	0	0	1
	Total	0	0	1	0	0	1
- Agregados linfoides	Mínimos	0	0	1	0	0	0
	Total	0	0	1	0	0	0
Esófago	Nº de examinados	1	1	1	1	1	1
- Agregados linfoides	Mínimos	0	0	0	0	0	1
	Total	0	0	0	0	0	1
Ovarios	Nº de examinados	0	0	0	1	1	1
- Quistes Foliculares	Presentes	0	0	0	1	0	0
Total	Total	0	0	0	1	0	0
- Cuerpo lúteo prominente	Presentes	0	0	0	0	1	0
	Total	0	0	0	0	1	0
Páncreas	Nº de examinados	1	1	1	1	1	1
- Atrofia acinar	Mínimos	0	0	1	1	0	1
	Total	0	0	1	1	0	1
- Agregados linfoides	Mínimos	0	0	0	1	0	0
	Total	0	0	0	1	0	0
Cefálica derecha	Nº de examinados	0	0	0	0	0	0
Safena derecha	Nº de examinados	0	0	0	0	0	0
Piel (protocolo)	Nº de examinados	1	1	1	1	1	1
- Hiperplasia epidérmica	Mínima	0	0	0	0	0	1
	Moderada	0	0	0	1	0	0
	Total	0	0	0	1	0	1
Médula espinal	Nº de examinados	1	1	1	1	1	1
- Hemorragia	Mínima	0	0	1	1	1	1

	Leve	0	1	0	0	0	0
	Total	0	1	1	1	1	1
Bazo	Nº de examinados	1	1	1		1	1
Esternón y médula ósea	Nº de examinados	0	0	0	0	0	0
Estómago	Nº de examinados	1	1	1	1	1	1
Testículos	Nº de examinados	1	1	1	0	0	0
- Inmudurez	Presente	1	1	1	0	0	0
Total	Total	1	1	1	0	0	0
Timo	Nº de examinados	1	1	1	1	1	1
- Quiste/s	Presente	0	0	0	0	1	0
	Total	0	0	0	0	1	0
- Involución/atrofia	Mínima	0	0	0	0	1	0
Total	Total	0	0	0	0	1	0
Vejiga urinaria	Nº de examinados	1	1	1	1	1	1
Cuello uterino	Nº de examinados	0	0	0	1	1	1
- Mucificación epitelial	Presente	0	0	0	1	1	1
	Total	0	0	0	1	1	1
Útero	Nº de examinados	0	0	0	1	1	1
- Congestión	Mínima	0	0	0	0	1	0
	Total	0	0	0	0	1	0
Ciego	Nº de examinados	1	0	0	1	0	0
- Tejido adiposo submucoso prominente	Mínimo	1	0	0	1	0	0
	Total	1	0	0	1	0	0
Trompa de Fallopio	Nº de examinados	0	0	0	1	1	1
Ganglios linfáticos mesentéricos	Nº de examinados	0	0	0	1	0	0
- Macrófagos pigmentados aumentados	Leve	0	0	0	1	0	0
	Total	0	0	0	1	0	0
Hallazgos individuales en todos los animales							

Las observaciones patológicas de los animales individuales se muestran en la TABLA 36, a continuación:

TABLA 36

5

Macropatología e histopatología - hallazgos individuales en todos los animales			
Grupo	1	2	3
Compuesto	Glico-mAb (anti-EGFR)		
Dosis	1,5	4,5	12
Observaciones patológicas			
Sexo	Macho	Grupo de dosis	1

ES 2 424 388 T3

Nº de animal	0623	Semana del estudio	11
Peso corporal terminal	2715,0 gramos	Día del estudio del	77
NECROPSIA		HISTOPATOLOGÍA	
Ciego:		Ciego:	
- Área(s) elevada(s); aspecto mucoso, múltiple, hasta 3 mm		- Tejido adiposo submucoso prominente, mínimo, focal	
Colon:		Colon:	
- Área(s) elevada(s); aspecto mucoso, múltiple, hasta 2 mm		Lesión no significativa	
		Riñones:	
		- Infiltración linfocítica cortical, - Mínima	
Hígado:		Hígado:	
- Área(s) pálida(s) de la hendidura media; Una, subcapsular, 3 mm		-Foco inflamatorio celular, -Mínimo	
		Pulmones y bronquios:	
		- Células inflamatorias en la mucosa/submucosa de los bronquios/bronquiolos, -Leve	
Estómago:		Estómago:	
- Área(s) elevada(s) del cuerpo; mucosa, una, cercana al antro, 3 mm		> Sin lesión significativa	
		Testículos:	
		- Inmadurez, - Presente	
Sexo	Macho	Grupo de dosis	2
Nº de animal	0461	Semana del estudio del sacrificio	18
Peso corporal terminal	2573,0 gramos	Día del estudio del sacrificio	125
NECROPSIA		HISTOPATOLOGÍA	
		Riñones:	
		- Infiltración linfocítica cortical, - Mínima	
Hígado:		Hígado:	
- Área(s) pálida(s) de la hendidura media; Una, subcapsular, 4 mm		-Foco inflamatorio celular, -Mínimo - Vacuolización del hepatocito . Hendidura media, -Media	
Pulmones y bronquios:		Pulmones y bronquios:	
- Colapso incompleto; Lóbulos derechos		- Macrófagos alveolares, - Mínimo	
		Médula espinal:	

		- Hemorragia, - Leve, - Multifocal	
		Testículos	
		- Inmadurez, - Presente	
Sexo	Macho	Grupo de dosis	3
Nº de animal	0463	Semana del estudio del sacrificio	18
Peso corporal terminal	2919,0 gramos	Día del estudio del sacrificio	125
NECROPSIA		HISTOPATOLOGÍA	
		Hígado:	
		-Foco inflamatorio celular, -Mínimo	
		Pulmones y bronquios:	
		- Células linfoides/inflamatorias perivasculares, - Mínimas -Agregados linfoides, -Mínimos, -Focales	
		Páncreas:	
		- Atrofia acinar, -Mínima, -Focal	
		Médula espinal:	
		- Hemorragia, - Mínima	
		Testículos	
		- Inmadurez, - Presente	
El animal no presenta observaciones evidentes			
Sexo	Hembra	Grupo de dosis	1
Nº de animal	0590	Semana del estudio del sacrificio	11
Peso corporal terminal	3176,0 gramos	Día del estudio del sacrificio	77
NECROPSIA		HISTOPATOLOGÍA	
Ciego:		Ciego:	
- Área(s) elevada(s); aspecto mucoso, múltiple, hasta 2 mm		- Tejido adiposo submucoso prominente, - Mínimo, - Multifocal	
Colon:		Colon:	
- Área(s) elevada(s); aspecto mucoso, múltiple, hasta 2 mm		Lesión no significativa	
		Riñones:	
		- Infiltración linfocítica cortical, - Leve, - Focal	
		Safena izquierda:	
		- Hiperplasia epidérmica, - Mínima	
Hígado:		Hígado:	

- Área(s) pálida(s) de la hendidura media; Una, subcapsular, 3 mm		-Foco inflamatorio celular, -Mínimo	
Ganglios linfáticos mesentéricos:		Ganglios linfáticos mesentéricos:	
- Congestionados, -Mínimamente		- Macrófagos pigmentados aumentados, -Leve	
Ovarios:		Ovarios:	
- Quiste(s); izquierdo, uno, lleno de líquido fluido, 4 mm		- Quiste(s) folicular(es), - Presente(s)	
		Páncreas:	
		- Atrofia acinar, -Mínima - Agregados linfoides, - Mínimos	
		Piel (protocolo):	
		Hiperplasia epidérmica, - Moderada	
		Médula espinal:	
		- Hemorragia, - Mínima	
Bazo:		Bazo:	
- Engrosamiento de la cápsula; Área, Difusa		> Sin lesión significativa	
		Cuello uterino:	
		- Mucificación epitelial, - Presente	
Sexo	Hembra	Grupo de dosis	2
Nº de animal	0462	Semana del estudio del sacrificio	18
Peso corporal terminal	2910,0 gramos	Día del estudio del sacrificio	125
NECROPSIA		HISTOPATOLOGÍA	
		Riñones:	
		- Infiltración linfocítica cortical, - Mínima, Focal	
		Hígado:	
		-Foco inflamatorio celular, -Mínimo	
Pulmones y bronquios:		Pulmones y bronquios:	
- Colapso incompleto; Lóbulos izquierdos		Sin lesiones significativas	
Ovarios:		Ovarios:	
- Área(s) elevada(s); una en cada ovario, izquierdo, 3 mm; derecho, 2 mm (folículos)		Cuerpo lúteo prominente, - Presente	
		Médula espinal:	
		- Hemorragia, - Mínima	
Timo:		Timo:	
- Pequeño; 1,066g		- Quistes(s), - Presente(s)	
		- Atrofia/Involución, - Mínima	

		Cuello uterino:	
		- Mucificación epitelial, - Presente	
Útero		Útero	
- Congestionado, mínimamente		- Congestionado, mínimamente	
Sexo	Hembra	Grupo de dosis	3
Nº de animal	0612	Semana del estudio del sacrificio	18
Peso corporal terminal	2934,0 gramos	Día del estudio del sacrificio	125
NECROPSIA		HISTOPATOLOGÍA	
		Riñones:	
		- Infiltración linfocítica cortical, - Mínima, Focal	
Hígado:		Hígado:	
- Área(s) pálida(s) de la hendidura media; Una, subcapsular, 3 mm		-Foco inflamatorio celular, -Mínimo - Proliferación biliar ductal, -Mínima	
Pulmones y bronquios:		Pulmones y bronquios:	
- Colapso incompleto; Lóbulos izquierdos.		- Macrófagos, -Mínimos	
		- Células linfoides/inflamatorias perivasculares, - Mínimas	
		Esófago:	
		- Agregados linfoides, -Mínimos	
		Páncreas:	
		- Atrofia acinar, -Mínima, - Focal	
		Piel (protocolo):	
		Hiperplasia epidérmica, - Mínima	
		Médula espinal:	
		- Hemorragia, - Mínima	
		Cuello uterino:	
		- Mucificación epitelial, - Presente	

Los pesos corporales individuales de los monos cynomolguss se muestran en la TABLA 37, a continuación:

TABLA 37: Valores individuales del peso corporal

(N° de animal)	Peso corporal (kg) el día													
	-17	-9	1*	8*	15*	22*	29	36	50	57	64	71	77	Cambio de peso (kg)
														D1 a 71
Grupo 1: GA201-ge, 1,5 mg/kg /vez														
623m	2,67	2,65 (-0,02)	2,69 (+0,04)	2,72 (+0,03)	2,76 (+0,04)	2,82 (-0,14)	2,72 (+0,10)	2,65 (-0,07)	2,71 (+0,06)	2,73 (+0,02)	2,74 (+0,13)	2,71 (-0,03)	2,75 (+0,04)	+0,06
5900	2,98	2,92 (-0,06)	2,97 (+0,05)	3,14 (+0,17)	3,13 (+0,01)	3,01 (-0,12)	3,06 (+0,05)	3,00 (-0,06)	3,19 (+0,19)	3,16 (-0,03)	3,18 (+0,07)	3,27 (+0,09)	3,23 (-0,04)	+0,27
Grupo 2: GA201-ge, 4,5 mg/kg /vez														
461m	2,50	2,56 (+0,06)	2,53 (-0,03)	2,47 (-0,06)	2,53 (+0,06)	2,53 NC	2,53 NC	2,61 (+0,08)	2,53 (-0,06)	2,45 (-0,08)	2,54 (+0,09)	2,59 (-0,01)		+0,03
462f	2,87	2,96 (+0,09)	2,91 (-0,05)	2,82 (-0,09)	2,95 (+0,13)	2,89 (-0,06)	2,88 (-0,01)	2,79 (-0,09)	2,91 (+0,12)	2,95 (+0,04)	3,02 (-0,03)	2,96 (-0,06)		+0,05
Grupo 3: GA201-ge, 12 mg/kg /vez														
463m	2,69	2,81 (+0,12)	2,86 (+0,05)	2,74 (-0,12)	2,81 (+0,07)	2,81 NC	2,81 NC	2,81 NC	2,75 (-0,06)	2,71 (-0,04)	2,92 (+0,21)	3,09 (+0,11)		+0,23
612f	2,84	2,96 (+0,12)	2,92 (-0,04)	2,98 (+0,06)	3,06 (+0,08)	3,01 (-0,05)	3,01 NC	2,94 (-0,07)	2,91 (-0,03)	2,81 (-0,10)	3,04 (+0,23)	3,10 (+0,05)		+0,18
														+0,09

Conclusiones

- 5 No hubo efecto del tratamiento en los lugares de inyección ni tampoco hallazgos clínicos que pudieran considerarse relacionados con el tratamiento con el glico-mAb (anti-EGFR). Los cambios en el peso corporal estuvieron dentro de los límites esperados. En el examen macroscópico no se observaron hallazgos que pudieran considerarse relacionados con el tratamiento y el peso de los órganos de los animales se halló dentro de los límites esperados. En conclusión, el tratamiento con 1,5, 4,5 o 12 mg/kg/vez se toleró bien sin hallazgos claros de toxicidad sistémica.
- 10 El EGFR no es una diana tumoral específica, dado que está presente en la superficie de varios tejidos normales que incluyen el hígado, el riñón y la piel. Los anticuerpos anti-EGFR con la región Fc de la IgG1 humana se han administrado anteriormente a humanos y han mostrado un perfil de efectos secundarios tolerable (Vanhoefer, U. et al., Clin. Oncol. 1 de enero de 2004;22(1):175-84; Needle MN, Semin Oncol. Octubre de 2002;29 (5 Supl. 14):55-60).
- 15 Claramente, surgirían preocupaciones al administrar un anticuerpo anti-EGFR a un humano o un mamífero con una CCDA significativamente aumentada, debido a la actividad citotóxica potenciada que podría presentarse contra tejidos normales críticos tales como el hígado, el riñón y la piel. Sorprendentemente, los presentes inventores han observado que la administración *in vivo* a mamíferos de un anticuerpo anti-EGFR con la Fc modificada, tal y como se describe anteriormente y con una actividad CCDA aumentada hasta 1000 veces, no comportó toxicidades significativas. Las concentraciones del anticuerpo se mantuvieron por encima de 1 microgramo por mililitro durante, al menos, 4 semanas (y por encima de 100 microgramos por mililitro en algunos animales). Tales niveles de exposición son típicos de la terapia con anticuerpos. La CCDA máxima para el anticuerpo de este estudio se logra a
- 20

concentraciones de 1 microgramo por mililitro. Las administraciones de dosis únicas con dosis de 40 y 100 mg del anticuerpo anti-EGFR (el anticuerpo pariente de rata ICR62) a pacientes humanos con cáncer ha demostrado la focalización específica contra los tumores *in vivo* (Modjtahedi, H. et al., Br J Cancer. Enero de 1996;73(2):228-35.). Las células efectoras de los monos cynomolgus tienen receptores FcγRIII altamente homólogos y se ha observado que median la CCDA potenciada con anticuerpos modificados en la Fc (y con anticuerpos glicosilados para niveles incrementados de oligosacáridos no fucosilados en la región Fc). El nivel de incremento de la CCDA es muy similar al que se observa en las células efectoras humanas (CMSP).

En resumen, hemos observado que los anticuerpos anti-EGFR modificados en la Fc para obtener una afinidad de unión Fc-FcγRIII aumentada y una CCDA aumentada pueden administrarse a mamíferos para proporcionar concentraciones superiores a 1 microgramo del anticuerpo por mililitro de suero durante un periodo de, al menos, 4 semanas, para proporcionar exposiciones al fármaco que normalmente se asocian a una acumulación significativa del anticuerpo en las células diana *in vivo*, sin conllevar toxicidades significativas.

Se puede medir la toxicidad de una molécula de unión a antígeno de la presente invención, y/o se puede determinar mediante la utilización de cualquiera de los métodos y/o parámetros (por ejemplo valores bioquímicos sanguíneos, indicadores histopatológicos, etc.) descritos en este documento anteriormente, o mediante cualquier medio conocido por un experto en la materia. Un experto en la materia entiende que el concepto de nivel clínico significativo de toxicidad es un nivel que excede los niveles que habitualmente se aceptan en la Food and Drug Administration de EE.UU. para los anticuerpos administrados clínicamente.

Ejemplo 5

Modificaciones los CDR de la cadena ligera: determinación de residuos determinantes de especificidad

Mediante la utilización de los métodos descritos anteriormente, se generaron variantes de las regiones variables de la cadena ligera del anti-EGFR a partir de la construcción de la región variable de la cadena ligera I-KC (Id. de Sec. N°:46 e Id. de Sec. N°:45), en el que la secuencia que codifica el residuo de aminoácido en varias posiciones en la ICR62 CDR de rata se sustituyó con el residuo de aminoácido correspondiente de una secuencia génica variable de la línea germinal humana. Esto permitió la identificación de residuos determinantes de especificidad, que, tal y como se describe con anterioridad, son residuos que interactúan con el antígeno y en los cuales las modificaciones pueden tener un efecto en la afinidad de unión. La TABLA 38 muestra las sustituciones que se realizaron en la CDR de la construcción de la región variable de la cadena ligera I-KC (Id. de Sec. N°:45):

TABLA 38: CDR minimizadas de la cadena ligera

NOMBRE DE LA CONSTRUCCIÓN	SUSTITUCIÓN DE AMINOÁCIDO REALIZADA EN EL I-KC	CDR DE LA CADENA LIGERA EN LA QUE SE REALIZA LA SUSTITUCIÓN	EFFECTO DE LA UNIÓN AL ANTÍGENO
I-KC (Id de Sec. N°:45)	Sin modificaciones; construcción parental de	N/A	++
I-KC1	N30R*	CDR1	++
I-KC2	Y32W	CDR1	++
I-KC3	N34O	CDR1	+/-
I-KC4	N50T	CDR2	+/-
I-KC5	T51A	CDR22	++
I-KC6	N52S	CDR2	++
I-KC7	N53S	CDR2	++
I-KC8	T56S	CDR2	++
I-KC9	F94Y	CDR3	++

*Identificada de acuerdo con la nomenclatura estándar (por ejemplo, "N30R" significa que el residuo de asparagina (N) en la posición 30 de la Id de Sec. N°:45 se sustituye con un residuo de arginina (R)). La numeración de la Id. de

Todos los residuos sustituidos identificados anteriormente derivaron de una secuencia aceptora VK1_6 humana a excepción de la sustitución Y32W, en la que W de una secuencia relacionada con la línea germinal humana se sustituyó por Y en la posición 32 en la Id. de Sec. N°:45.

Todas las construcciones de la variante I-KC (I-KC1 a I-KC9) se emparejaron con una región variable de la cadena pesada que incluye la construcción I-HHD (Id. de Sec. N°:16 e Id. de Sec. N°:15) y se llevó a cabo un ensayo de unión de acuerdo con los métodos descritos en los EJEMPLOS previos. Las construcciones I-KC1 a I-KC9 se compararon con la construcción I-KC (Id. de Sec. N°:46 e Id. de Sec. N°:45) respecto a la afinidad de unión al EGFR en las células diana A431 (figura 29 y figura 30). Tal y como se observa en la figura 29, la modificación del residuo 34 con su correspondiente en la secuencia humana (N34G) resultó en una leve disminución de la afinidad de unión (el valor CE50 aumentó en un factor de 10). Tal y como se muestra en la figura 30, la modificación del residuo 50 con un residuo humano (N50T) también resultó en una leve disminución de la afinidad de unión. Por consiguiente, estos datos indican que N34 y N50 de las construcciones de la cadena ligera I-KC del anti-EGFR son residuos determinantes de especificidad involucrados en la unión al antígeno. El resto de construcciones mantuvieron una actividad de unión comparable a la construcción I-KC (Id. de Sec. N°:45) (figuras 29 y 30).

En base a estos datos, para el injerto del bucle CDR del proceso de humanización, sólo se requieren ciertas partes de la CDR. Por ejemplo, en la CDR1 de la construcción I-KC, las posiciones 24-27 y 29-33 no deben injertarse del donante (por ejemplo, ICR62). En la CDR3, el residuo F94 es la única diferencia entre el anticuerpo de rata ICR62 y el homólogo más cercano de la línea germinal humana (VK1_6), y su intercambio con un residuo humano se tolera en relación al mantenimiento de la afinidad de unión. Por consiguiente, mediante la selección de la secuencia VH y J apropiada, la CDR3 puede presentarse completamente humana (por ejemplo, sin necesitar el injerto del bucle en la CDR3).

Así, estos datos indican que la cadena ligera, cuando se empareja con una construcción de cadena pesada quimérico (por ejemplo, humanizado) específico para el EGFR, puede ser completamente humana (por ejemplo, a partir de una secuencia génica V de la cadena ligera humana) y mantener la unión específica al EGFR, aunque con una afinidad de unión ligeramente menor en comparación con las cadenas ligeras en las que se mantienen los residuos determinantes de especificidad del donante.

EJEMPLOS 6

Modificaciones en las CDR de la cadena pesada: determinación de residuos determinantes de especificidad

Mediante la utilización de los métodos descritos anteriormente, se generaron variantes de las regiones variables de la cadena pesada del anti-EGFR a partir de la construcción de la región variable de la cadena pesada I-HHD (Id. de Sec. N°:16 e Id. de Sec. N°:15), en el que la secuencia que codifica el residuo de aminoácido en varias posiciones en la ICR62 CDR de rata se sustituyó por el residuo de aminoácido correspondiente a la posición Kabat de una secuencia génica variable de la línea germinal humana (por ejemplo, VH1-10, IGHV5_51). La TABLA 39 muestra las sustituciones que se realizaron en la CDR de la construcción de la región variable de la cadena pesada I-HHD (Id. de Sec. N°:15):

TABLA 39: CDR minimizadas de la cadena PESADA

NOMBRE DEL CONSTRUCCIÓN	SUSTITUCIÓN DE AMINOÁCIDO REALIZADA EN EL I-HHD (NUMERACIÓN DE KABAT)	POSICIÓN DEL AMINOÁCIDO CORRESPONDIENTE EN LA ID. DE SEC. N°:15	CDR DE LA CADENA PESADA EN LA QUE SE REALIZA LA SUSTITUCIÓN	EFFECTO DE LA UNIÓN AL ANTÍGENO
I-HHD	Sin modificaciones; construcción parental de las variantes SDR	N/A	N/A	++
I-HHD-1	F27G**	27	CDR1 (Chothia)	++
I-HHD-2	T28G	28	CDR1 (Chothia)	++

I-HHD-3	F29I	29	CDR1 (Chothia)	+
I-HHD-4	D31E	31	CDR1	++
I-HHD-5	N52T	52	CDR2	+
I-HHD-6	P52aA	53	CDR2	++
I-HHD-7	N53I	54	CDR2	++
I-HHD-8	Y56T	57	CDR2	+/-
I-HHD-9	S57A	58	CDR2	++
I-HHD-10	V100bG	106	CDR3	+/-
I-HHD-11	A102V	109	CDR3	++

* La numeración de Kabat para la cadena pesada varia respecto a la numeración de la Id. de Sec. N°:15 debido a que la numeración de Kabat permite la presencia de aminoácidos adicionales en las CDR. La numeración de la TABLA 39 hace referencia a la numeración de Kabat. Un experto en la materia puede determinar fácilmente la posición correspondiente en la Id. de Sec. N°:15 y además se indica aquí arriba.

**Identificada de acuerdo con la nomenclatura estándar (por ejemplo, "F27G" significa que el residuo de fenilalanina (F) en la posición de Kabat 27 del I-HHD (posición 27 de la Id. de Sec. N°:15) se sustituye con un residuo de glicina (G)).

Cada una de las variantes de la construcción I-HHD (I-HHD-1 a I-HHD-11) se emparejó con una región variable de la cadena ligera que incluye la construcción I-KC (Id. de Sec. N°:46 e Id. de Sec. N°:45) y se llevó a cabo un ensayo de unión de acuerdo con los métodos descritos en los EJEMPLOS previos. Las construcciones I-HHD-1 a I-HHD-11 se compararon con la construcción I-KC (Id. de Sec. N°:46 e Id. de Sec. N°:45) respecto a la afinidad de unión al EGFR en las células diana A431 (figuras 31 y 32). Tal y como se observa en las figuras 31 y 32, las sustituciones de los residuos en las posiciones 27 (F27G) (construcción I-HHD-1) y 28 (T28S) (construcción I-HHD-2) de la CDR1 Chothia y la posición 31 (D31E) (construcción I-HHD-4) de la CDR1 Kabat no mostraron influencia en la unión al antígeno (es decir, se mantuvo la unión al antígeno en comparación con la construcción pariente I-HHD). De modo similar, las sustituciones de residuos en las posiciones 52a (P52aA) (construcción I-HHD-6), 53 (N53I) (construcción I-HHD-7), y 57 (S57A) (construcción I-HHD-9) de la CDR2 Kabat, y la sustitución del residuo en la posición 102 de la CDR3 Kabat (A102V) (construcción I-HHD-11) no mostró ninguna influencia en la unión al antígeno.

Tal y como se muestra en la figura 31, tanto la modificación del residuo 29 de la CDR1 Chothia por un residuo humano correspondiente (P29I) (construcción I-HHD-3) como la modificación del residuo 52 de la CDR2 Kabat por un residuo humano correspondiente (N52T) (construcción I-HHD-5) resultaron en una modesta disminución de la afinidad de unión en comparación con la construcción pariente I-HHD (valor de CE50 aumentó en un factor de 2-3).

Tal y como se muestra en la figura 32, tanto la modificación del residuo 56 de la CDR2 Kabat por un residuo humano correspondiente (Y56T) (construcción I-HHD-8) como la modificación del residuo 100b de la CDR3 Kabat por un residuo humano correspondiente (V100bG) (construcción I-HHD-10) mostraron una leve disminución de la afinidad de unión al antígeno en comparación con la construcción pariente I-HHD (valor de CE50 aumentó en un factor de 10).

Por consiguiente, estos datos indican que F29 y N52 de la construcción I-HHD de la cadena pesada del anti-EGFR son residuos determinantes de especificidad que tienen una influencia modesta en la unión al antígeno. Estos datos también indican que Y56 y V100b de la construcción I-HHD de la cadena pesada del anti-EGFR son residuos determinantes de especificidad que tienen una influencia significativa en la unión al antígeno.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Umana, Pablo Mossner, Ekkehard

5 <120> Moléculas de unión a antígeno que se unen a EGFR, vectores que los codifican, y usos de los mismos.

<130> 1975.043PC04/TJS/T-M

<150> US 60/836,371

10 <151> 2006-08-09

<160> 147

<170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1 <211> 120

<212> PRT

<213> Rattus sp.

20 <220>

<223> ICR62 VH

<400> 1

```

Gln Val Asn Leu Leu Gln Ser Gly Ala Ala Leu Val Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15

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

Lys Ile His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35          40          45

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Asn Glu Lys Phe
50          55          60

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

Met Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys
85          90          95

Thr Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100         105         110

Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser

```

25 115 120

<210> 2

<211> 359

<212> DNA

30 <213> Rattus sp.

<220>

<223> ICR62 VH

35 <400> 2

```

cagggtcaacc tactgcagtc tggggctgca ctggtgaagc ctggggcctc tgtgaagttg      60
tcttgcaaag gttctgggtt tacattcact gactacaaga tacactgggt gaagcagagt      120
catggaaaga gcottgagtg gattgggtat tttaatccta acagtgggta tagtacctac      180
aatgaaaagt tcaagagcaa ggccacattg actgcagaca aatccaccga tacagcctat      240
atggagctta ccagtctgac atctgaggac tctgcaacct attactgtac aagactatcc      300
ccaggggggtt actatgttat ggatgcctgg ggtcaaggag cttcagtcac tgtctcctc      359

```

<210> 3

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico rata-humano

<400> 3

```

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

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

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35          40          45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50          55          60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100         105         110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115         120

```

<210> 4

<211> 360

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> DNA quimérico rata-humano

<400> 4

```

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc      60
tcttgcaaag cttctggatt tacattcact gactacgcca tcagctgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcaatccta acagtgggta tagtacctac      180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac      240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc      300
ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca      360

```

- 5 <210> 5
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido quimérico rata-humano
- 10 <400> 5
- Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
- Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
- Lys Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
- Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
- Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
- Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
- Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
 100 105 110
- Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
- 15 <210> 6
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> DNA quimérico rata-humano
- 20 <400> 6
- caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
 tcctgcaagg gttctgggtt tacattcact gactacaaga tacactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcgggta tagtacctac 180
 gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
 ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360
- 25 <210> 7
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
 <223> Polipéptido quimérico rata-humano

<400> 7

```

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
          20           25           30

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Asn Glu Lys Phe
          50           55           60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
          100          105          110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115           120

```

- 5 <210> 8
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
 <223> DNA quimérico rata-humano

<400> 8

```

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc      60
tcctgcaagg gttctgggtt tacattcact gactacaaga tacactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggtcgcagtg gatgggatat ttcaacccta acagcgggta tagtacctac      180
aatgaaaagt tcaagagcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac      240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc      300
ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaagggg ccaccgtgac cgtctcctca      360

```

- 15 <210> 9
 <211> 120
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido quimérico rata-humano

25 <400> 9

```

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

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

```

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

<210> 10
<211> 360
5 <212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> DNA quimérico rata-humano
<400> 10

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctctgggtt tacattcact gactactata tgcactgggt ggcacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtgggta tagtacctac 180
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accgccgaca cgtccatcag cacagcctac 240
atggagctga gcaggetgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

15 <210> 11
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Polipéptido quimérico rata-humano
<400> 11

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

<210> 12
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> DNA quimérico rata-humano

<400> 12

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggagcctc ggtgaaggtc 60
 tcctgcaagg gttctgggtt tacattcact gactacaaga tccactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggctcgagtg gatgggatac ttcaacccta acagcgggta tagtacctac 180
 gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatg accgcccaga cgtccatcag cacagcctac 240
 atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggcctgt attactgtgc gagactatcc 300
 ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 13
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido quimérico rata-humano

<400> 13

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14
<211> 360
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> DNA quimérico rata-humano

<400> 14

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggagcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg gttctggttt tacattcact gactacaaga tccactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggatac ttcaacccta acagcgggta cagtacttac 180
aacgagaagt tcaagagccg ggtcaccatg accgccgaca cgtccatcag cacagcctac 240
atggagctga gcaggtgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggggggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 15
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido quimérico rata-humano

<400> 15

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

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

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln. Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16
<211> 360
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> DNA quimérico rata-humano

<400> 16

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctctggttt cacattcact gactacaaga tacactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcgggta tagtacctac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
ccagggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaagggg ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 17
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido quimérico rata-humano

<400> 17

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18
<211> 360
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> DNA quimérico rata-humano
<400> 18

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcttgcaagg gttctgggtt cacattcact gactacaaga tatcctgggt gcgacaggct 120
cctggacaag ggtctgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcgggta tagtacctac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcgggt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 19
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido quimérico rata-humano
<400> 19

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

<210> 20
<211> 360
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> DNA quimérico rata-humano

<400> 20

5

```

caggtgcagc tggcgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc      60
tcctgcaagg gttctggttt tacattcact gactacaaga tacactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcggtta ttcgaactac      180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac      240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggcctgtg attactgtgc gagactatcc      300
ccaggcgggt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca      360

```

<210> 21

<211> 120

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido quimérico rata-humano

15

<400> 21

```

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
          20           25           30

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ala Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
          50           55           60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
          100          105          110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

20

<210> 22

<211> 360

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> DNA quimérico rata-humano

<400> 22

30

```

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc      60
tcttgcaagg gttctgggtt tacattcact gactacaaga tacactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcgggta tgccacgtac      180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaaca aatccacgag cacagcctac      240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc      300
ccagggcggtt actatgttat ggatgectgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctctca      360

```

<210> 23
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido quimérico rata-humano
 <400> 23

```

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

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

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

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
          85          90          95

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100          105          110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 24
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> DNA quimérico rata-humano
 <400> 24

```

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggagcctc ggtgaaggtc      60
tcttgcaagg cctctgggtt tacattcact gactactata tgcactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtgggta tagtacctac      180

```

agcccaagct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc 300
 ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaagggg ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 25
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido quimérico rata-humano

<400> 25

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

<210> 26
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> DNA quimérico rata-humano

<400> 26

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggagcctc ggtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cctctgggtt tacattcact gactactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtgggta tagtacctac 180
 aacgagaagt tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc 300
 ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaagggg ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 27
 <211> 120

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido quimérico rata-humano

<400> 27

```

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

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

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

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
          65          70          75          80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
          85          90          95

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
          100          105          110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 28
<211> 360
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> DNA quimérico rata-humano

<400> 28

```

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggagcctc ggtgaaggtc      60
tcttgcaagg cctctgggta cacattcact gactactata tgcactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtgggta tagtacctac      180
agcccaagct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac      240
ctgcagtggg gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc      300
ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca      360

```

<210> 29
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido quimérico rata-humano

<400> 29

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

<210> 30
<211> 360
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> DNA quimérico rata-humano

<400> 30

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggagcctc ggtgaaggtc 60
tcttgcaagg cctctgggta cacattcact gactactata tgcactgggt gcgacaggee 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtgggta tagtacctac 180
aacgagaagt tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgectac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 31
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido quimérico rata-humano

<400> 31

Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Thr
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 32
<211> 360
5 <212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> DNA quimérico rata-humano

<400> 32

cagatgcagc tgggtgcagtc tggggccagag gtgaagaagc ctggaacctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctctgggtt tacattcact gactactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatecta acagtggta tagtacctac 180
agcccaagct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggctcggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

15 <210> 33
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Polipéptido quimérico rata-humano

<400> 33

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 34
<211> 360
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> DNA quimérico rata-humano

<400> 34

cagatgcagc tggatgcagtc tgggccagag gtgaagaagc ctggaacctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctctggttt tacattcact gactactata tgcactgggt ggcacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggctgg atcaatccta acagtgggta tagtacctac 180
aacgagaagt tccaaggcca ggtcaccatc tcagecgaca agtccatcag caccgcctac 240
ctgcagtggg gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctctca 360

<210> 35
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido quimérico rata-humano

<400> 35

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 36
<211> 360
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> DNA quimérico rata-humano

<400> 36

cagatgcagc tggatgcagtc tgggcccagag gtgaagaagc ctggaacctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctctgggtt tacattcact gactacaaga tccactgggt gcgacaggcc 120
cgcggaacaac ggctcgagtg gatcggtctg atcaatccta acagtgggta tagtacctac 180
aacgagaagt tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggccctggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca 360

<210> 37
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido quimérico rata-humano

<400> 37

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

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

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 38
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> DNA quimérico rata-humano

<400> 38

```

cagatgcagc tgggtgcagtc tggggccagag gtgaagaagc ctggaacctc ggtgaaggtc      60
tcctgcaagg cctctggttt tacattcact gactacaaga tccactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcgggta tagtacctac      180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac      240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc      300
ccaggcgggt actatgttat ggatgcctgg ggccaagggg ccaccgtgac cgtctcctca      360

```

<210> 39
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido quimérico rata-humano

<400> 39

```

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20        25        30

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50        55        60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65        70        75        80

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100       105       110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115       120

```

<210> 40
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> DNA quimérico rata-humano

<400> 40

```

gaggtgcagc tcgtgcagtc tggcgctgag gtgaagaagc ctggcgagtc gttgaagatc    60
tcctgcaagg gttctgggta ttcattcact gactacaaga tccactgggt gcgacaggcc    120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggatat ttcaacccta acagcggtta tagtacctac    180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac    240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagactatcc    300
ccaggcggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctcctca    360

```

5

<210> 41
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 41

```

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1           5           10          15

```

Ala His Ser

15

<210> 42
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

20

<400> 42
 atggactgga cctggaggat cctctcttg gtggcagcag ccacaggagc ccactcc 57

<210> 43
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

25

<220>
 <223> ICR62 VL

30

<400> 43

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10          15

```

```

Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Tyr
 20          25          30

```

```

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

```

```

Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50          55          60

```

```

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65          70          75          80

```

```

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
 85          90          95

```

```

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr
 100         105

```

<210> 44
 <211> 324
 <212> DNA
 5 <213> Rattus sp.

 <220>
 <223> ICR62 VL

 10 <400> 44

 gacatccaga tgaccagtc tccttcattc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcact 60
 atcaactgca aagcaagtca gaatattaac aattacttaa actgggatca gcaaaagctt 120
 ggagaagctc ccaaacgcct gatataataa acaaacaatt tgcaaacagg catcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tggtagagat tacacactca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg ccacatattt ctgcttgcag cataatagtt ttcccacggt tggagctggg 300
 accaagctgg aactgaaacg tacg 324

 <210> 45
 15 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Polipéptido quimérico rata-humano

 <400> 45

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

 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
 20 25 30

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

 Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
 85 90 95

 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105

 25 <210> 46
 <211> 324
 <212> DNA
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> DNA quimérico rata-humano

 <400> 46
 35

```

gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga cggggtcacc 60
atcacctgcc gggcaagtcg gggcattaac aattacttaa attggtacca gcagaagcca 120
gggaaagccc ctaagcgccg gatctataat accaacaact tgcagacagg cgtcccatca 180
agggtcagcg gcagtggatc cgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg ccacctatta ctgcttgagc cataatagtt ttcccacggt tggccagggc 300
accaagctcg agatcaagcg tacg 324

```

<210> 47
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 47

```

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1           5           10           15

```

```

Phe Pro Gly Ala Arg Cys
                20

```

<210> 48
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 48

```

atggacatga gggccccgc tcagctcctg ggctcctgc tgccttggtt cccaggtgcc 60
aggtgt 66

```

<210> 49
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido quimérico rata-humano
 <400> 49

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

<210> 50
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> DNA quimérico rata-humano

<400> 50

gatatccaga tgaccacagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga ccgggtcacc 60
 atcacctgcc gggcaagtca gggcattaac aattacttaa attggtacca gcagaagcca 120
 gggaaagccc ctaagcgcct gatctataat accaacaact tgcagacagg cgtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc cgggacagaa tacactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg ccacctatta ctgcttgag cacaatagtt ttcccacggt tggccagggc 300
 accaagctcg agatcaagcg tacgggtg 327

<210> 51
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido quimérico rata-humano

<400> 51

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
85 90 95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val
100 105

<210> 52
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> DNA quimérico rata-humano

<400> 52

gatatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga ccgggtcacc 60
atcacctgca aagcaagtca gaattattaac aattacttaa actggtacca gcagaagcca 120
gggaaagccc ctaagcgct gatctataat accaacaact tgcagacagg cgtcccatca 180
aggttcagcg gcagtgatc cgggacagaa tacactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg ccacctatta ctgcttgag cataatagtt ttcccacgtt tggccagggc 300
accaagctcg agatcaagcg tacgggtg 327

<210> 53
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena pesada CDR1 Kabat
 <400> 53

Asp Tyr Lys Ile His
1 5

<210> 54
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena pesada CDR1 Kabat

<400> 54
 gactacaaga tacac 15

<210> 55
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena pesada CDR1 Kabat

<400> 55

Asp Tyr Ala Ile Ser
1 5

5

<210> 56
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Cadena pesada CDR1 Kabat

<400> 56

15

gactacgccca tcagc 15

<210> 57
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Cadena pesada CDR1 Kabat

25

<400> 57

Asp Tyr Tyr Met His
1 5

30

<210> 58
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Cadena pesada CDR1 Kabat

<400> 58

40

gactactata tgcac 15

<210> 59
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Cadena pesada CDR1 Chothia

50

<400> 59

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
1 5

55

<210> 60
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>

60

<223> Cadena pesada CDR1 Chothia

<400> 60
 ggttttacat tcactgacta c 21

5 <210> 61
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cadena pesada CDR1 Chothia
 <400> 61

15 **Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr**
 1 5

<210> 62
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cadena pesada CDR1 Chothia

25 <400> 62
 ggttacacat tcactgacta c 21

30 <210> 63
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena pesada CDR1 Chothia

35 <400> 63

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
 1 5

40 <210> 64
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cadena pesada CDR1 Chothia

<400> 64
 ggttatcat tcactgacta c 21

50 <210> 65
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Cadena pesada CDR1 AbM

<400> 65

60 **Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Lys Ile His**
 1 5 10

<210> 66
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cadena pesada CDR1 AbM
 <400> 66
 10 ggttttacat tcactgacta caagatacac 30
 <210> 67
 <211> 10
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena pesada CDR1 AbM
 20 <400> 67
 Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Ala Ile Ser
 1 5 10
 <210> 68
 25 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Cadena pesada CDR1 AbM
 <400> 68
 ggttttacat tcactgacta cgccatcagc 30
 35 <210> 69
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Cadena pesada CDR1 AbM
 <400> 69
 Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met His
 1 5 10
 45 <210> 70
 <211> 30
 <212> DNA
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena pesada CDR1 AbM
 55 <400> 70
 ggttttacat tcactgacta ctatatgcac 30
 <210> 71
 <211> 10
 60 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Cadena pesada CDR1 AbM

<400> 71

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met His
1 5 10

<210> 72

<211> 30

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada CDR1 AbM

<400> 72

ggttacacat tcactgacta ctatatgcac 30

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada CDR1 AbM

<400> 73

Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Lys Ile His
1 5 10

<210> 74

<211> 30

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada CDR1 AbM

<400> 74

ggttattcat tcactgacta caagatacac 30

<210> 75

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada CDR2 Kabat

<400> 75

Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 76

<211> 51

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada CDR2 Kabat

<400> 76
tattttaatc ctaacagtgg ttatagtacc tacaatgaaa agttcaagag c 51

5 <210> 77
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cadena pesada CDR2 Kabat

<400> 77

Gly Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

15 **Gly**

<210> 78
<211> 51
<212> DNA
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada CDR2 Kabat

25 <400> 78
gggatcaatc ctaacagtgg ttatagtacc tacgcacaga agttccaggg c 51

<210> 79
<211> 17
30 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada CDR2 Kabat

35 <400> 79

Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

40 <210> 80
<211> 51
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Cadena pesada CDR2 Kabat

<400> 80
tatttcaacc ctaacagcgg ttatagtacc tacgcacaga agttccaggg c 51

50 <210> 81
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Cadena pesada CDR2 Kabat

<400> 81

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

5 <210> 82
<211> 51
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cadena pesada CDR2 Kabat

<400> 82
tggatcaatc ctaacagtgg ttatagtacc tacgcacaga agtttcaggg c 51

15 <210> 83
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cadena pesada CDR2 Kabat

<400> 83

25 Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

30 <210> 84
<211> 51
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada CDR2 Kabat

35 <400> 84
tggatcaatc ctaacagtgg ttatagtacc tacagcccaa gcttccaagg c 51

40 <210> 85
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Cadena pesada CDR2 Kabat

<400> 85

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Asn Glu Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

50 <210> 86
<211> 51
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena pesada CDR2 Kabat

5 <400> 86
 tggatcaatc ctaacagtgg ttatagtacc tacaacgaga agttccaagg c 51

<210> 87
 <211> 17
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena pesada CDR2 Kabat

15 <400> 87

Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly - -

20 <210> 88
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Cadena pesada CDR2 Kabat

<400> 88
 tatttcaacc ctaacagcgg ttattcgaac tacgcacaga agttccaggg c 51

30 <210> 89
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Cadena pesada CDR2 Kabat

<400> 89

40 **Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ala Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln**
1 5 10 15

Gly

45 <210> 90
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena pesada CDR2 Kabat

50 <400> 90
 tatttcaacc ctaacagcgg ttatgccacg tacgcacaga agttccaggg c 51

55 <210> 91
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena pesada CDR2 Chothia
 <400> 91
 5 **Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr**
 1 5
 <210> 92
 <211> 24
 10 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena pesada CDR2 Chothia
 15 <400> 92
 aatcctaaca gtggttatag tacc 24
 <210> 93
 20 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Cadena pesada CDR2 Chothia
 <400> 93
 <220>
 30 **Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Asn**
 1 5
 <210> 94
 <211> 24
 <212> DNA
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena pesada CDR2 Chothia
 <400> 94
 40 aacctaaca gcggttatc gaac 24
 <210> 95
 <211> 8
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena pesada CDR2 Chothia
 50 <400> 95
 <220>
 55 **Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ala Thr**
 1 5
 <210> 96
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Cadena pesada CDR2 Chothia
 <400> 96

aaccctaaca gcggttatgc cacg 24

<210> 97
 <211> 10
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena pesada CDR2 AbM

10 <400> 97

Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr
1 5 10

15 <210> 98
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cadena pesada CDR2 AbM

<400> 98
 tattttaatc ctaacagtgg ttatagtacc 30

25 <210> 99
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cadena pesada CDR2 AbM

<400> 99

35 **Gly Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr**
1 5 10

<210> 100
 <211> 30
 40 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cadena pesada CDR2 AbM

45 <400> 100
 gggatcaatc ctaacagtgg ttatagtacc 30

<210> 101
 50 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 55 <223> Cadena pesada CDR2 AbM

<400> 101

Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr
1 5 10

60 <210> 102
 <211> 30

<212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Cadena pesada CDR2 AbM
 <400> 102
 tggatcaatc ctaacagtgg ttatagtacc 30
 10 <210> 103
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cadena pesada CDR2 AbM
 <400> 103
 Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Asn
 20 1 5 10
 <210> 104
 <211> 30
 <212> DNA
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena pesada CDR2 AbM
 30 <400> 104
 tatttcaacc ctaacagcgg ttattcgaac 30
 <210> 105
 <211> 10
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena pesada CDR2 AbM
 40 <400> 105
 Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ala Thr
 1 5 10
 45 <210> 106
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Cadena pesada CDR2 AbM
 <400> 106
 tatttcaacc ctaacagcgg ttatgccacg 30
 55 <210> 107
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cadena pesada CDR3 Kabat Chothia AbM

<400> 107

Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala

1 5 10

5 <210> 108
<211> 33
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cadena pesada CDR3 Kabat Chothia AbM

<400> 108
ctatccccag gcggttacta tgttatggat gcc 33

15 <210> 109
<211> 328
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <220>
<223> IgG1 constant región

<400> 109

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 110

<211> 987

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IgG1 constant región

<400> 110

accaagggcc catcggctct cccctggca cctcctcca agagcacctc tgggggcaca	60
gcgggccctgg gctgcctgg caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac	120
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccgctg tcctacagtc ctcaggactc	180
tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc	240
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agaaagcaga gcccaaattc	300
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	360
gtcttctct tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccgga cctgaggtc	420
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	480
gacggcgctgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	540
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	600
aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc	660
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc	720
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atccagcga catcgccgtg	780

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 840
tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 900
gggaacgtct tctcatgtct cgtgatgcat gaggtctctgc acaaccacta cacgcagaag 960
agcctctctcc tgtctccggg taaatga 987

5 <210> 111
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Kabat Cadena ligera CDR1
 <400> 111

Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asn Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

15 <210> 112
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Kabat Cadena ligera CDR1

25 <400> 112
 aaagcaagtc agaattattaa caattactta aac 33

30 <210> 113
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Kabat Cadena ligera CDR1
 <400> 113

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

40 <210> 114
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Kabat Cadena ligera CDR1
 <400> 114
 cgggcaagtc agggcattaa caattactta aat 33

50 <210> 115
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Kabat Cadena ligera CDR2
 <400> 115

Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr
1 5

5 <210> 116
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Kabat Cadena ligera CDR2
 <400> 116
 aatacaaaca attgcaaac a 21

15 <210> 117
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Kabat Cadena ligera CDR3
 <400> 117

Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
1 5

25 <210> 118
 <211> 21
 <212> DNA
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Kabat Cadena ligera CDR2

35 <400> 118
 aataccaaca actgcagac a 21

40 <210> 119
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Kabat Cadena ligera CDR3
 <400> 119
 ttgcagcata atagtttcc cacg 24

50 <210> 120
 <211> 361
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> DNA quimérico rata-humano
 <400> 120

gagggtgcagc tccgtgcagtc tggcgctgag gtgaagaagc ctggcgagtc gttgaagatc 60
tccctgcaagg gttctgggta ttcattcact gactacaaga tccactgggt gcgacagatg 120
cctggaaagg gctcagagt gatgggctac ttcaatccta acagtggtta tagtacctac 180

```

agcccaagct tccaaggcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagactatcc 300
ccaggcgggtt actatgttat ggatgcctgg ggccaaggga ccaccgtgac cgtctectca 360
g . 361

```

<210> 121
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido quimérico rata-humano

<400> 121

```

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20        25        30

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ser Pro Ser Phe
50        55        60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65        70        75        80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85        90        95

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100       105       110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115       120

```

<210> 122
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Kabat Cadena pesada CDR1

<400> 122
 gactacaaga tatcc 15

<210> 123
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Kabat Cadena pesada CDR1

<400> 123

Asp Tyr Lys Ile Ser
1 5

<210> 124
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> AbM Cadena pesada CDR1

<400> 124
ggttcacat tcactgacta caagatatcc 30

<210> 125
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> AbM Cadena pesada CDR1

<400> 125

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

<210> 126
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Kabat Cadena pesada CDR2

<400> 126
tacttcaatc ctaacagtgg ttatagtacc tacagcccaa gcttccaagg c 51

<210> 127
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Kabat Cadena pesada CDR2

<400> 127

Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 128
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia quimérica rata-humano (I-HHD-1)

<400> 128

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

<210> 129
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia quimérica rata-humano (I-HHD-2)

<400> 129

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

<210> 130
 <211> 120
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia quimérica rata-humano (I-HHD-3)

<400> 130

```

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

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

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
          50          55          60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
          100          105          110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 131

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia quimérica rata-humano (I-HHD-4)

<400> 131

```

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Glu Tyr
          20          25          30

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
          50          55          60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
          100          105          110

```

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 132
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia quimérica rata-humano (I-HHD-5)

<400> 132

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

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

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

Gly Tyr Phe Thr Pro Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 133
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia quimérica rata-humano (I-HHD-6)

<400> 133

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

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

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

Gly Tyr Phe Asn Ala Asn Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 134
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia quimérica rata-humano (I-HHD-7)

<400> 134

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

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

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Ile Ser Gly Tyr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 135
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> .Secuencia quimérica rata-humano (I-HHD-8)

<400> 135

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

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

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Thr Ser Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 136

5 <211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia quimérica rata-humano (I-HHD-9)

<400> 136

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

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

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

Gly Tyr Phe Asn Pro Asn Ser Gly Tyr Ala Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Ser Pro Gly Gly Tyr Tyr Val Met Asp Ala Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

15 <210> 137

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Secuencia quimérica rata-humano (I-HHD-10)

<400> 137

25

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

<210> 138

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia quimérica rata-humano (I-HHD-11)

<400> 138

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

<210> 139

<211> 108

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia quimérica rata-humano (I-KC1)

<400> 139

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
          20           25           30

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

Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
          85           90           95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
          100          105

```

10

<210> 140
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Secuencia quimérica rata-humano (I-KC2)

<400> 140

20

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Trp
          20           25           30

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

Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
          85           90           95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
          100          105

```

<210> 141
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia quimérica rata-humano (I-KC3)

<400> 141

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
          20           25           30

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

Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50           55           60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
          85           90           95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
      100           105
    
```

<210> 142
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia quimérica rata-humano (I-KC4)

<400> 142

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
      20           25           30

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

Tyr Thr Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50           55           60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
          85           90           95
    
```

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 143

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia quimérica rata-humano (I-KC5)

10 <400> 143

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 144

15 <211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Secuencia quimérica rata-humano (I-KC6)

<400> 144

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Asn Thr Ser Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
85 90 95

25

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 145
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia quimérica rata-humano (I-KC7)
<400> 145

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Asn Thr Asn Ser Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 146
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia quimérica rata-humano (I-KC8)
<400> 146

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

<210> 147

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia quimérica rata-humano (I-KC9)

10 <400> 147

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
100 105

REIVINDICACIONES

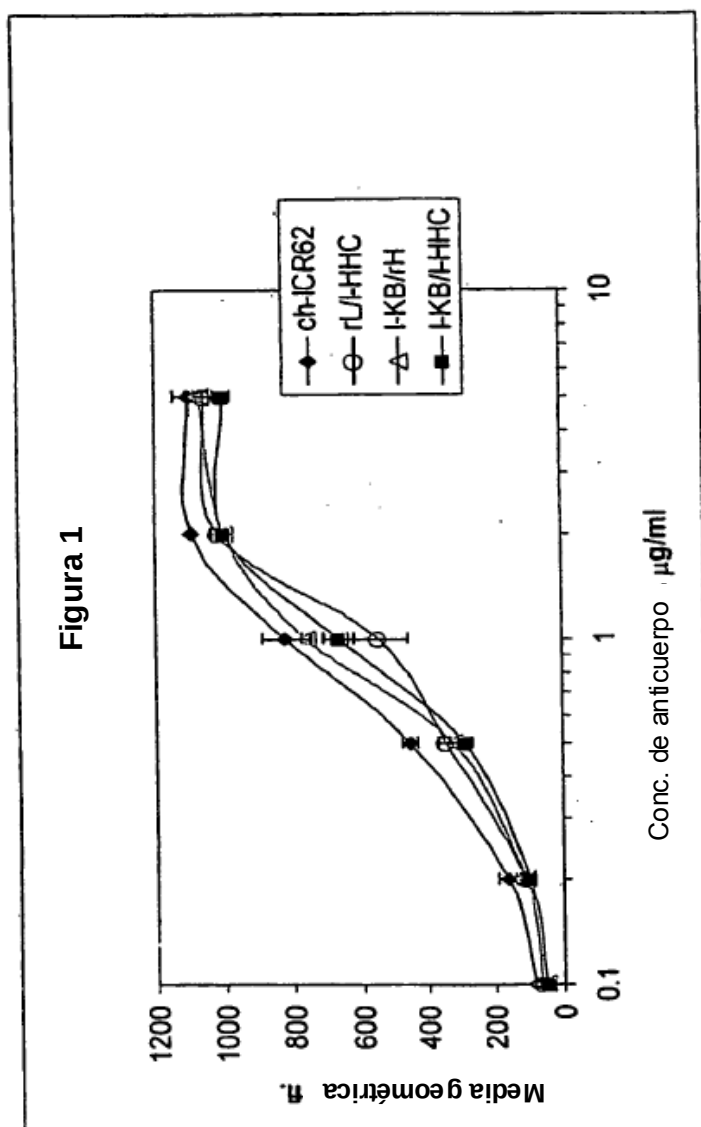
1. Un anticuerpo anti-EGFR humanizado que se une específicamente a EGFR humano, en el que dicho anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°: 128, Id. de Sec. N°:129, Id. de Sec. N°:131, Id. de Sec. N°:133, Id. de Sec. N°:134, Id. de Sec. N°:136, e Id. de Sec. N°:138; y una región variable de cadena ligera seleccionada de entre el grupo que consiste en Id. de Sec. N°:139, Id. de Sec. N°:140, Id. de Sec. N°:143, Id. de Sec. N°:144, Id. de Sec. N°:145, Id. de Sec. N°:146, e Id. de Sec. N°:147, en el que dicho anticuerpo comprende una región Fc y en el que dicho anticuerpo ha sido glicosmodificado:
- (a) para tener un aumento del porcentaje de oligosacáridos bisectados en la región Fc en comparación con el correspondiente anticuerpo no glicosmodificado,
 - (b) para tener un número reducido de residuos de fucosa en la región Fc en comparación con el correspondiente anticuerpo no glicosmodificado,
 - (c) para tener un aumento de la afinidad de unión al receptor Fc en comparación con el correspondiente anticuerpo no glicosmodificado, y/o
 - (d) para tener un aumento de la función efectora en comparación con el correspondiente anticuerpo no glicosmodificado, en el que los puntos (a) a (d) resultan de un aumento de actividad $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT III) en una célula huésped que expresa un polipéptido que posee dicha actividad.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el aumento en la función efectora se selecciona del grupo que consiste en: aumento de la citotoxicidad celular mediada por Fc, aumento de la unión a células NK, aumento de la unión a macrófagos, aumento de la unión a monocitos, aumento de la unión a células polimorfonucleares, aumento de la apoptosis inducida por señalización directa, aumento de la maduración de células dendríticas, y aumento de la primación de células T.
3. Una célula huésped que comprende un polinucleótido que codifica una región variable de la cadena pesada como se ha definido en reivindicación 1 y un polinucleótido que codifica una región variable de cadena ligera como se ha definido en la reivindicación 1, o un vector que comprende dichos polinucleótidos y en el que dicha célula huésped está modificada para expresar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que posee actividad $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT III).
4. La célula huésped de la reivindicación 3, en el que dicha célula huésped está modificada además para expresar al menos un ácido nucleico que codifica un polipéptido que posee actividad manosidasa II.
5. La célula huésped de la reivindicación 3, en el que dicho polipéptido es un polipéptido de fusión que comprende además el dominio de localización Golgi de un polipéptido residente en Golgi.
6. La célula huésped de la reivindicación 5, en el que dicho dominio de localización Golgi se selecciona del dominio de localización de manosidasa II, $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa I (GnT I), manosidasa I, $\beta(1,2)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa II (GnT II), y $\alpha 1-6$ fucosiltransferasa central.
7. Un método para producir un anticuerpo que es capaz de competir con el anticuerpo monoclonal ICR62 de rata para unirse al EGFR humano, en el que dicho anticuerpo monoclonal ICR62 de rata comprende una región variable de la cadena pesada de Id. de Sec. N°:1 y una región variable de cadena ligera de Id. de Sec. N°:43, dicho método comprende:
- (a) cultivar la célula huésped de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 en un medio bajo condiciones que permiten la expresión de dicho polinucleótido que codifica dicho polipéptido; y
 - (b) recuperar dicho anticuerpo en el que dicho anticuerpo comprende una región Fc y en el que dicho anticuerpo ha sido glicosmodificado
 - (i) para tener un aumento del porcentaje de oligosacáridos bisectados en la región Fc en comparación con el correspondiente anticuerpo no glicosmodificado,
 - (ii) para tener un número reducido de residuos de fucosa en la región Fc en comparación con el correspondiente anticuerpo no glicosmodificado,
 - (iii) para tener un aumento de la afinidad de unión al receptor Fc en comparación con el correspondiente anticuerpo no glicosmodificado, y/o
 - (iv) para tener un aumento de la función efectora en comparación con el correspondiente anticuerpo no glicosmodificado,
- en el que los puntos (i) a (iv) resultan de un aumento de la actividad $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT III) en una célula huésped que expresa un polipéptido que posee dicha actividad.
8. Un anticuerpo anti-EGFR humanizado que se une específicamente a EGFR humano, en el que dicho anticuerpo está producido mediante el método de la reivindicación 7.
9. Una composición que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 u 8 y un transportador

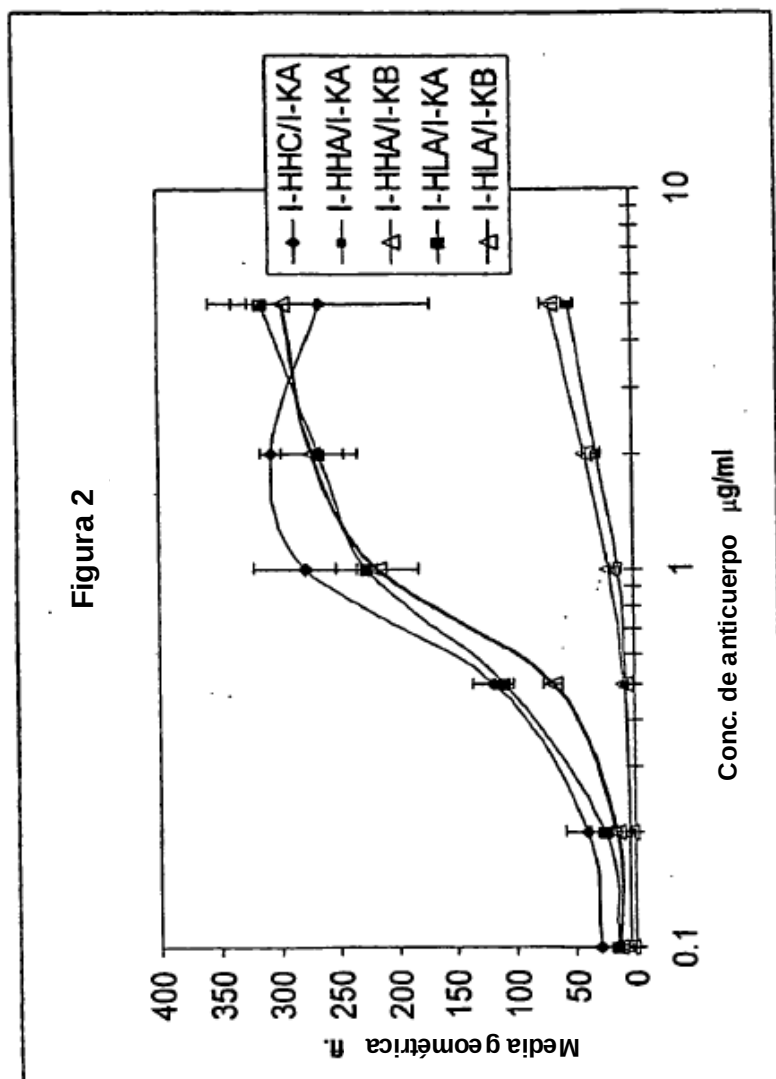
farmacéuticamente aceptable.

10. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 u 8 para utilizar en el tratamiento del cáncer.

5 11. El uso de un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 u 8 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

10 12. El anticuerpo de la reivindicación 10 o la utilización de la reivindicación 11, en el que dicho cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de riñón, y cáncer de cerebro.





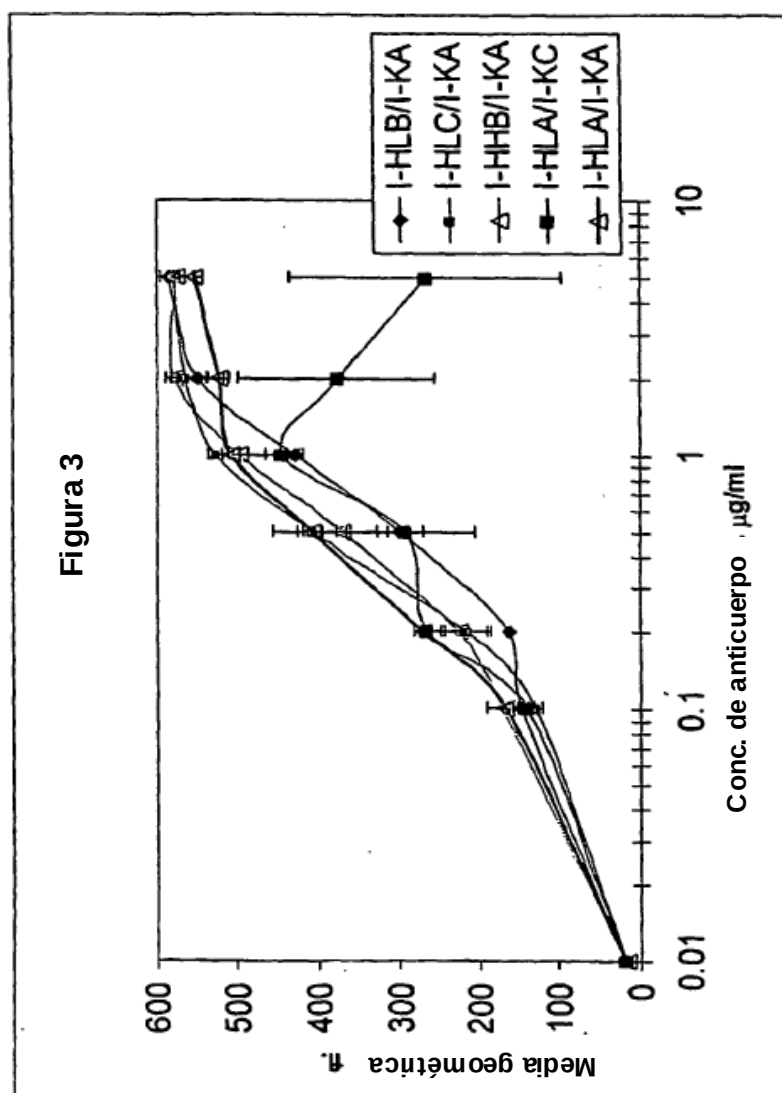


Figura 4

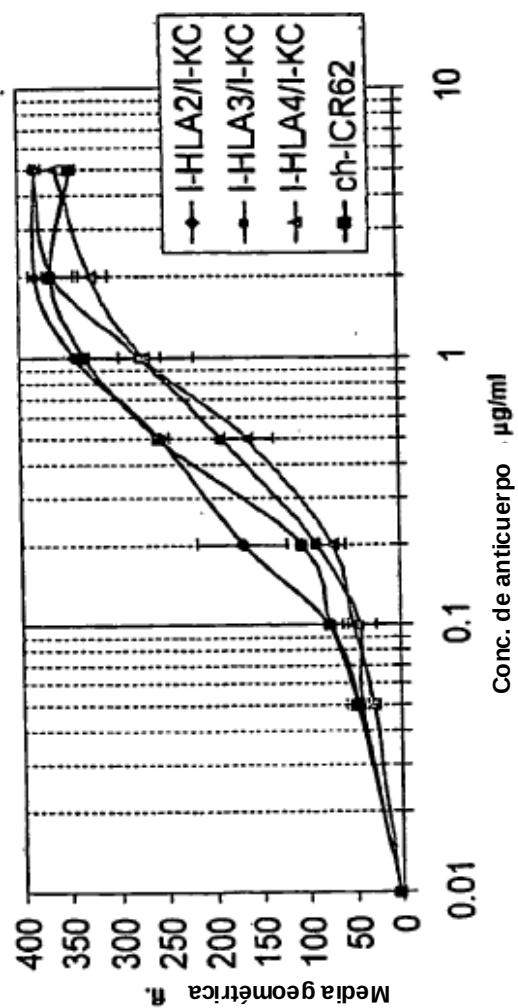


Figura 5

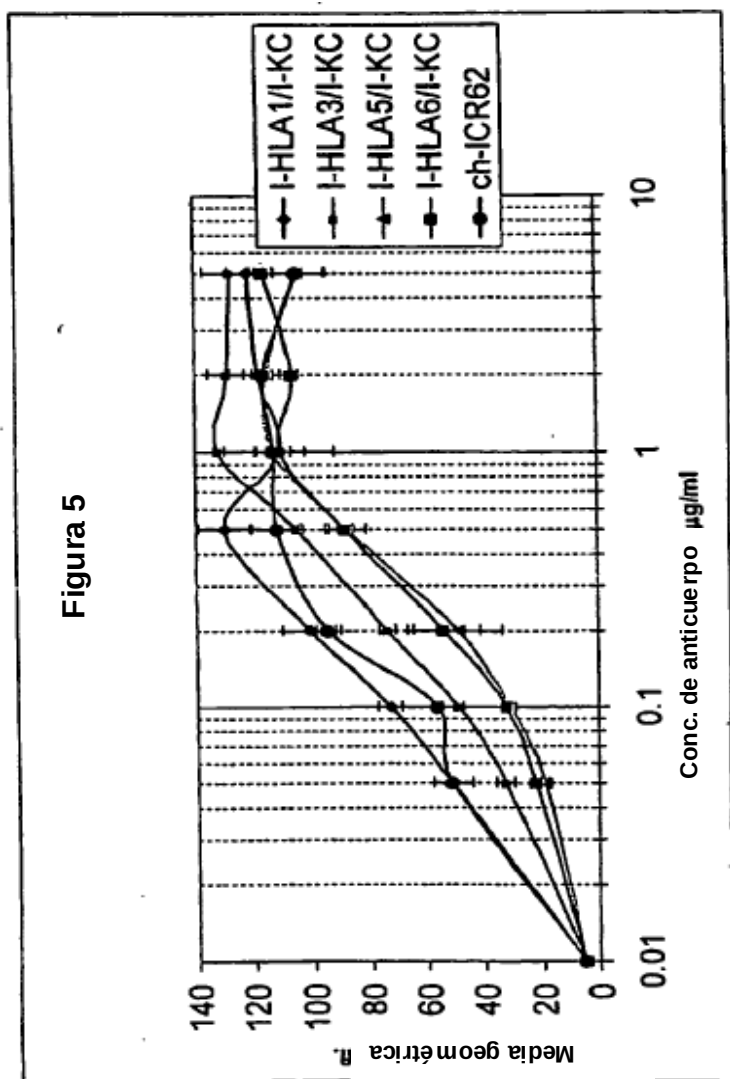
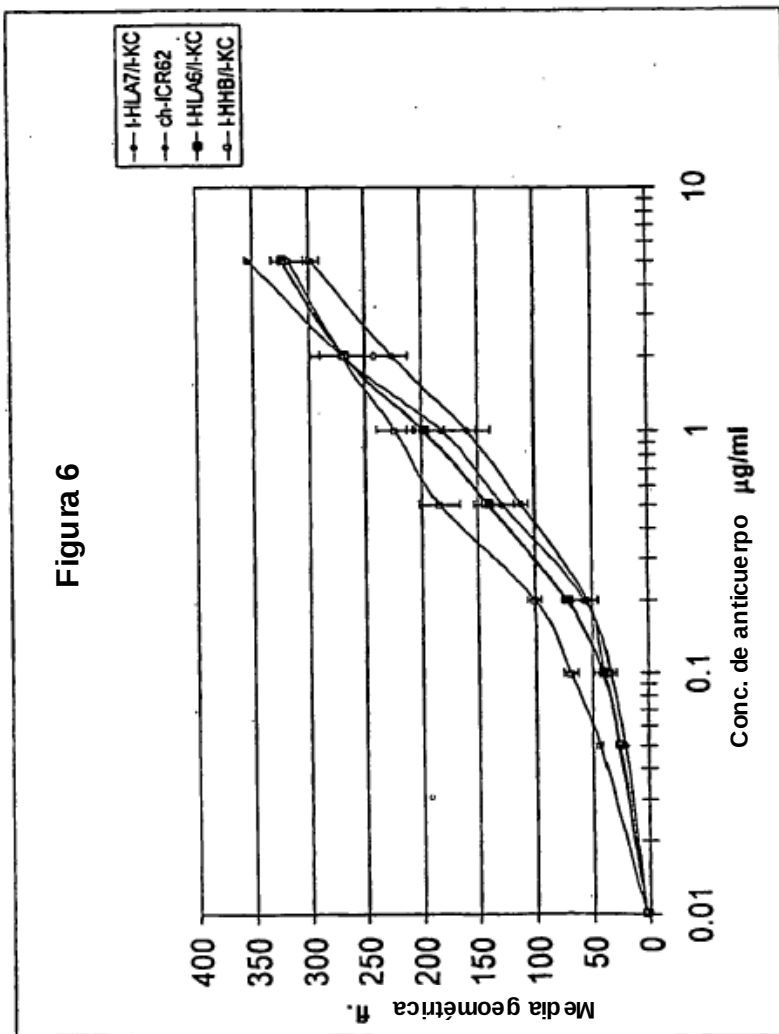


Figura 6



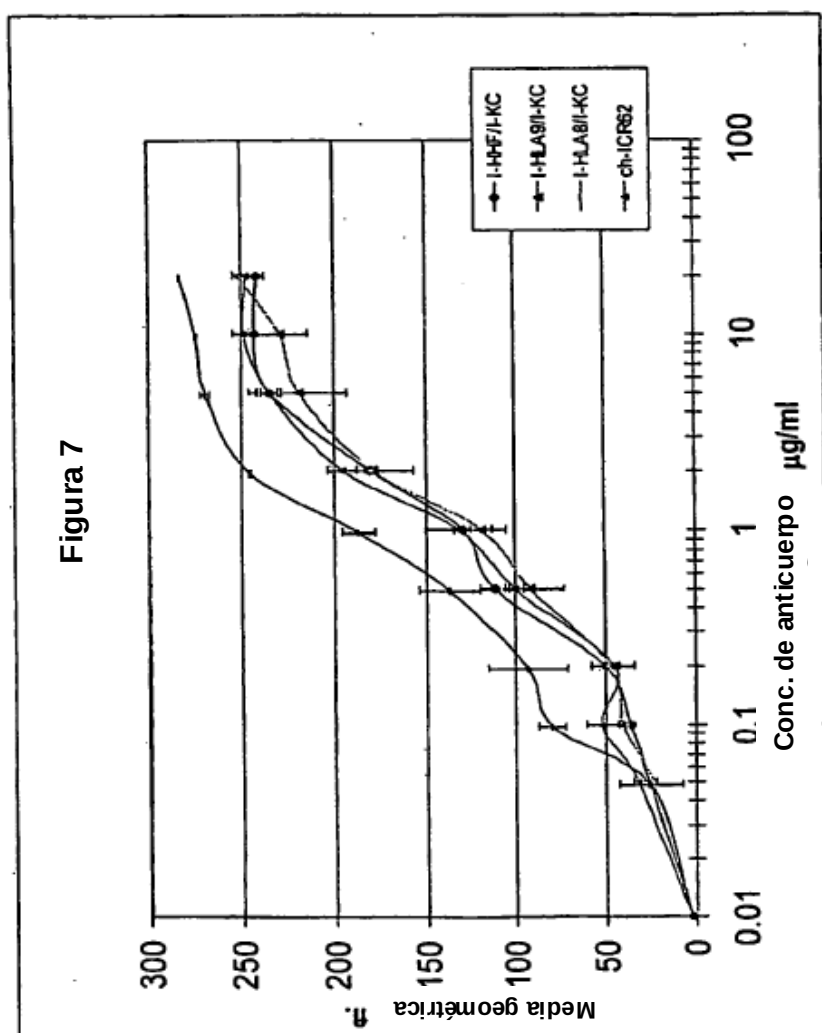


Figura 8

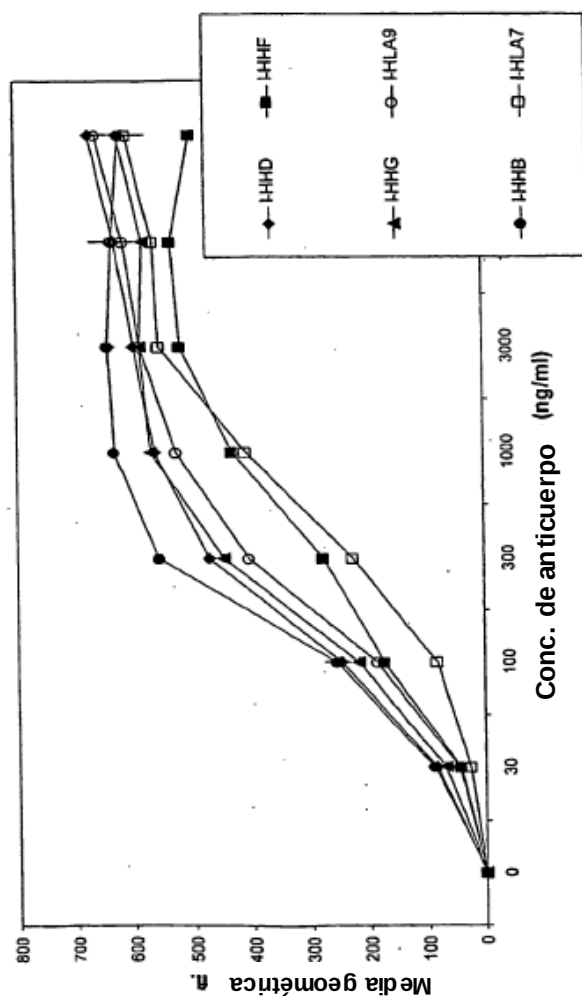
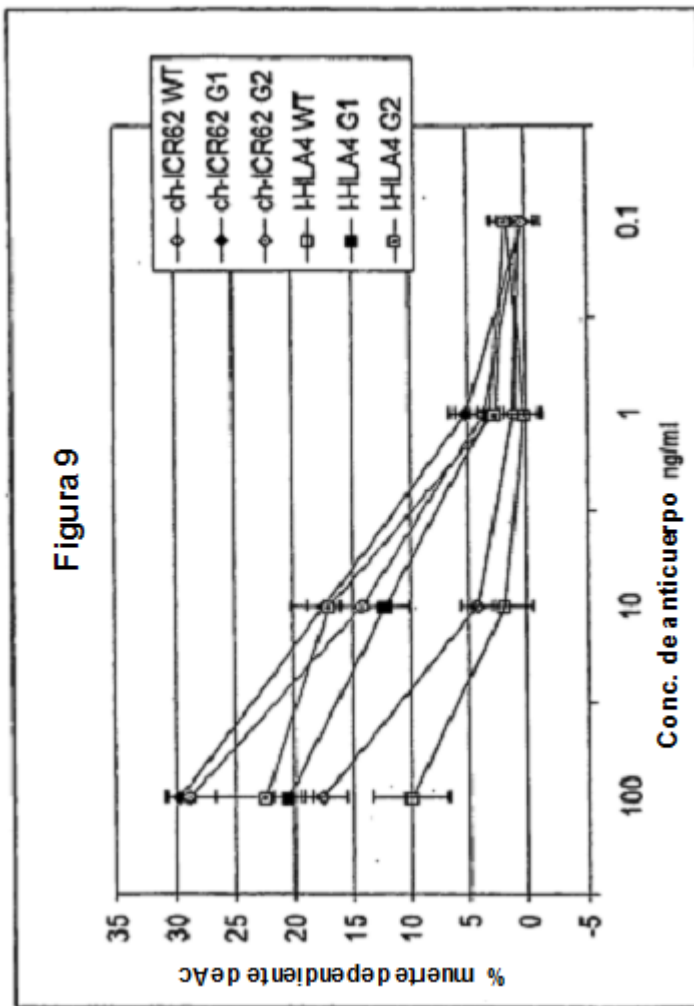


Figura 9



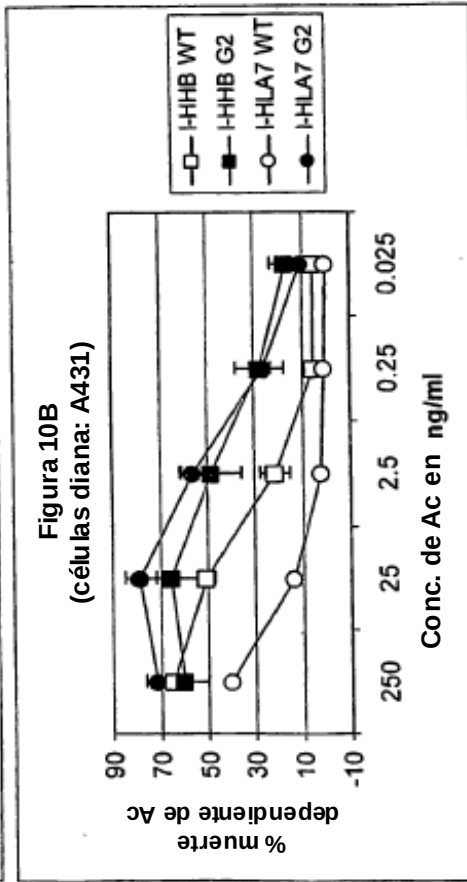
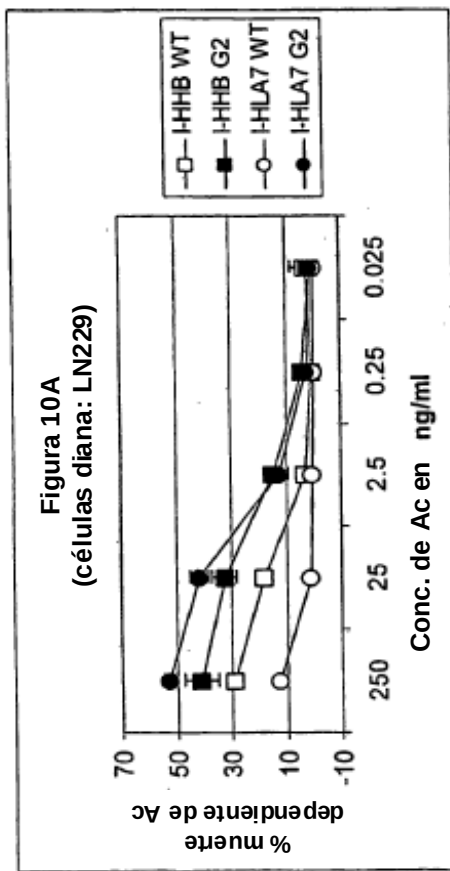


Figura 11

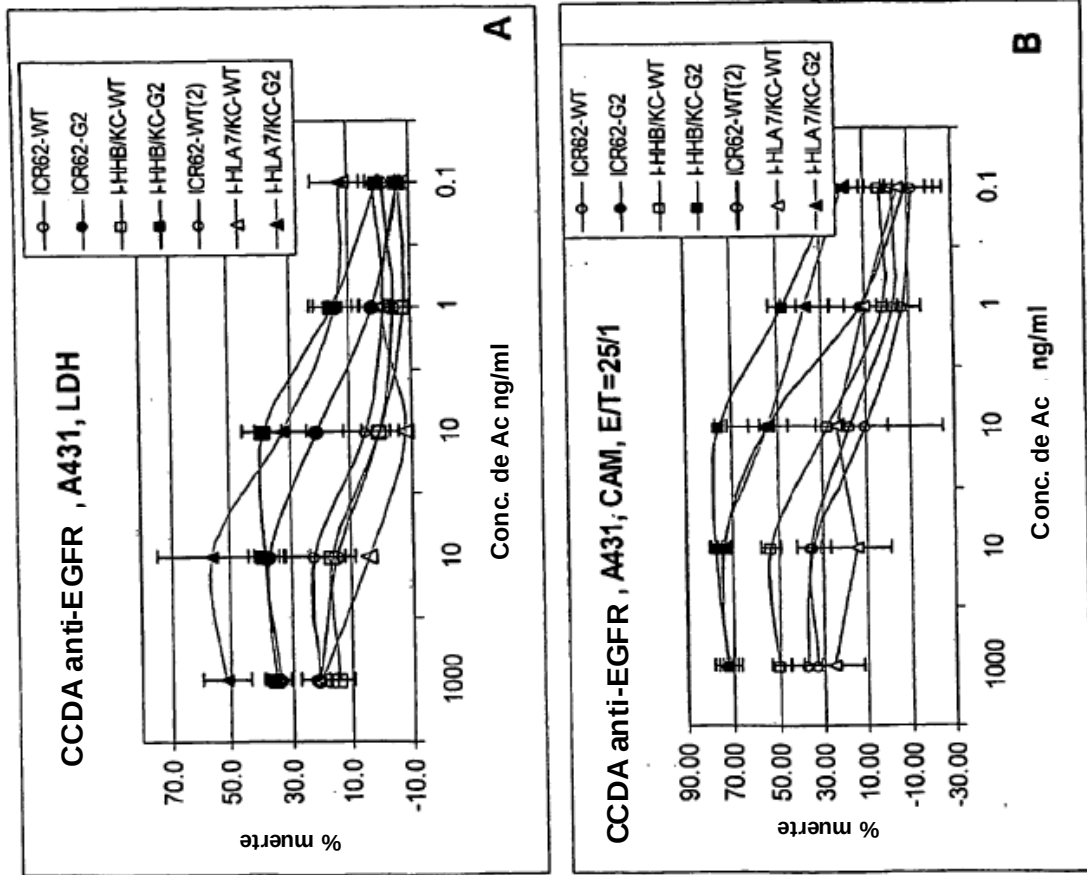
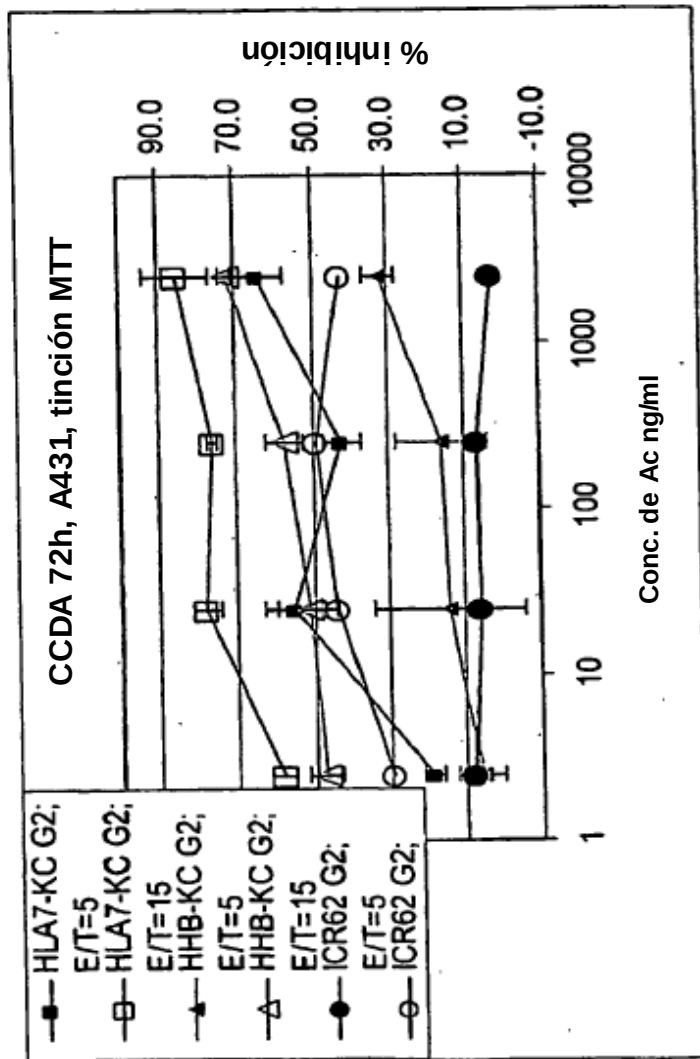


Figura 12



ICR62-VH	1 QVNLQGAALVKPGASVKLSCKSGQFTFTDYKIHVVKQSHGKSLVIGVFNPSNGYSTYNEKFKSKATLTADKSTDTAYWELTSLTSED
I-HHA.pep	1 Q.V...EVK...S...V...A.....A.S.R.AP.QG..M.GI.....AQ..QGRV.I.....S.....S.R...
I-HHB.pep	1 Q.V...EVK...S...V.....R.AP.QG..M.....AQ..QGRV.I.....S.....S.R...
I-HHC.pep	1 Q.V...EVK...S...V.....R.AP.QG..M.....RV.I.....S.....S.R...
I-KHD.pep	1 Q.V...EVK...S...V...A.....R.AP.QG..M.....AQ..QGRV.I.....S.....S.R...
I-KHE.pep	1 Q.V...EVK...S...V.....S.R.AP.QG..M.....AQ..QGRV.I.....S.....S.R...
I-HHF.pep	1 Q.V...EVK...S...V.....R.AP.QG..M.....N.AQ..QGRV.I.....S.....S.R...
I-HHG.pep	1 Q.V...EVK...S...V.....R.AP.QG..M.....AQ..QGRV.I.....S.....S.R...
I-HLA.pep	1 Q.V...EVK...S...V.....YM..R.AP.QG..M.WI.....AQ..QGRV.M..T.IS.....SR.R.D.
I-HLB.pep	1 Q.V...EVK...S...V.....R.AP.QG..M.....AQ..QGRV.M..T.IS.....SR.R.D.
I-HLC.pep	1 Q.V...EVK...S...V.....R.AP.QG..M.....SPS.QQGV.IS.....IS.....LQWS.KAS.
I-HLA1.pep	1 Q.V...EVK...S...V...A.....YM..R.AP.QG..M.WI.....QGVV.IS.....IS.....LQWS.KAS.
I-HLA2.pep	1 Q.V...EVK...S...V...A.....YM..R.AP.QG..M.WI.....SPS.QQGV.IS.....IS.....LQWS.KAS.
I-HLA3.pep	1 Q.V...EVK...S...V...A...Y.....YM..R.AP.QG..M.WI.....SPS.QQGV.IS.....IS.....LQWS.KAS.
I-HLA4.pep	1 Q.V...EVK...S...V...A...Y.....YM..R.AP.QG..M.WI.....SPS.QQGV.IS.....IS.....LQWS.KAS.
I-HLA5.pep	1 MQ.V...PEVK...T...V...A.....YM..R.AP.QG..M.WI.....SPS.QQGV.IS.....IS.....LQWS.KAS.
I-HLA6.pep	1 MQ.V...PEVK...T...V...A.....YM..R.AP.QG..M.WI.....SPS.QQGV.IS.....IS.....LQWS.KAS.
I-HLA7.pep	1 MQ.V...PEVK...T...V...A.....YM..R.AP.QG..M.WI.....QGVV.IS.....IS.....LQWS.KAS.
I-HLA8.pep	1 MQ.V...PEVK...T...V...A.....R.AR.QR..WI.....QGVV.IS.....IS.....LQWS.KAS.
I-HLA9.pep	1 E.Q.V...EVK...E.L.I.....YS.....R.AP.QG..M.....AQ..QGRV.I.....S.....S.R...
I-HLA10.pep	1 E.Q.V...EVK...E.L.I.....YS.....R.MP..G..M.....SPS.QQGV.IS.....IS.....LQWS.KAS.
ICR62-VH-WT	91 SATYYCTRLSPGGYYVMDANGQASVTVSS
I-HHA.pep	91 T.V...A.....TT.....
I-HHB.pep	91 T.V...A.....TT.....
I-HHC.pep	91 T.V...A.....TT.....
I-HHD.pep	91 T.V...A.....TT.....
I-HHE.pep	91 T.V...A.....TT.....
I-HHF.pep	91 T.V...A.....TT.....
I-HHG.pep	91 T.V...A.....TT.....
I-HLA.pep	91 T.V...A.....TT.....
I-HLB.pep	91 T.V...A.....TT.....
I-HLC.pep	91 T.V...A.....TT.....
I-HLA1.pep	91 T.M...A.....TT.....
I-HLA2.pep	91 T.M...A.....TT.....
I-HLA3.pep	91 T.M...A.....TT.....
I-HLA4.pep	91 T.M...A.....TT.....
I-HLA5.pep	91 T.M...A.....TT.....
I-HLA6.pep	91 T.M...A.....TT.....
I-HLA7.pep	91 T.M...A.....TT.....
I-HLA8.pep	91 T.V...A.....TT.....
I-HLA9.pep	91 T.V...A.....TT.....
I-HLA10.pep	91 T.M...A.....TT.....

Figura 13

Figura 14

Ensayo de unión FcgammaRIIIa-Fc utilizando células CHO que muestran FcgammaRIIIa recombinante humana

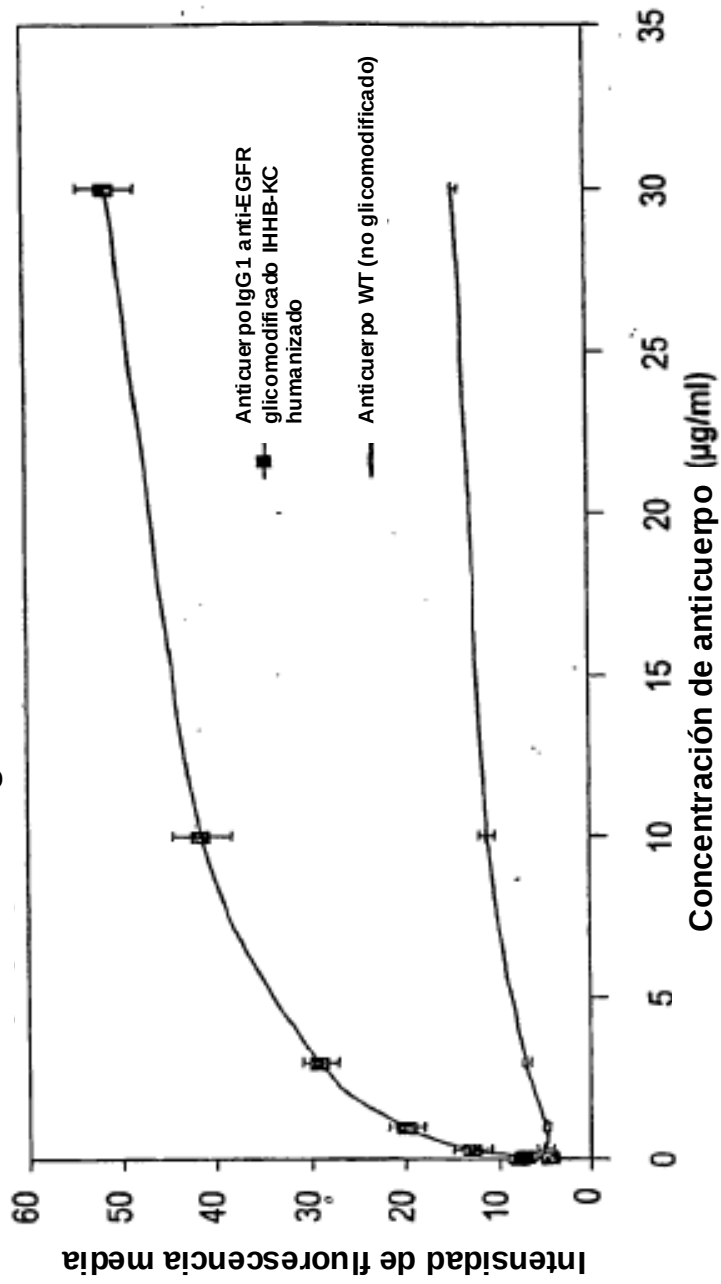


Figura 15

Perfil de oligosacárido EM-MALDI/TOF para el anticuerpo IgG1 anti-EGFR glico modificado IHHB-KC humanizado

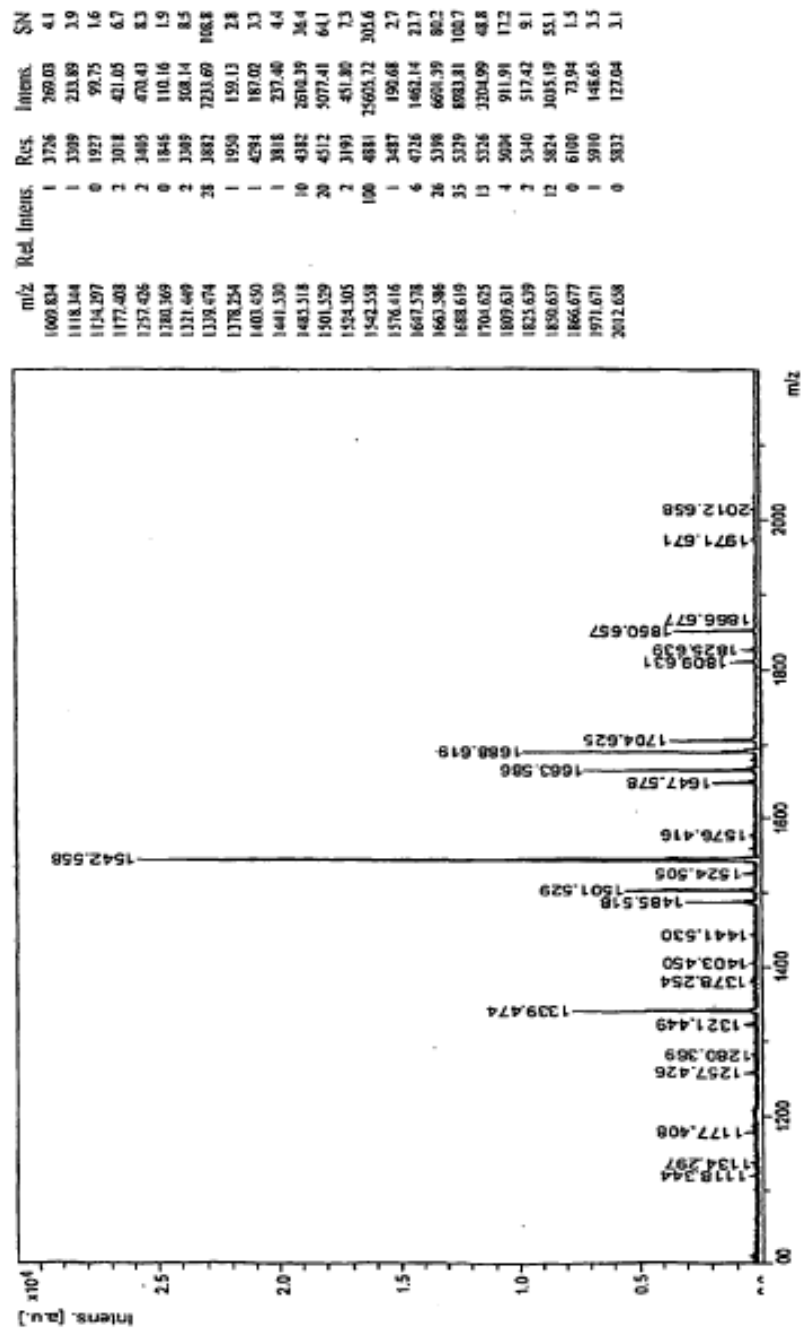


Figura 16

PERFIL DE PRECISI3N ANTI-EGFR

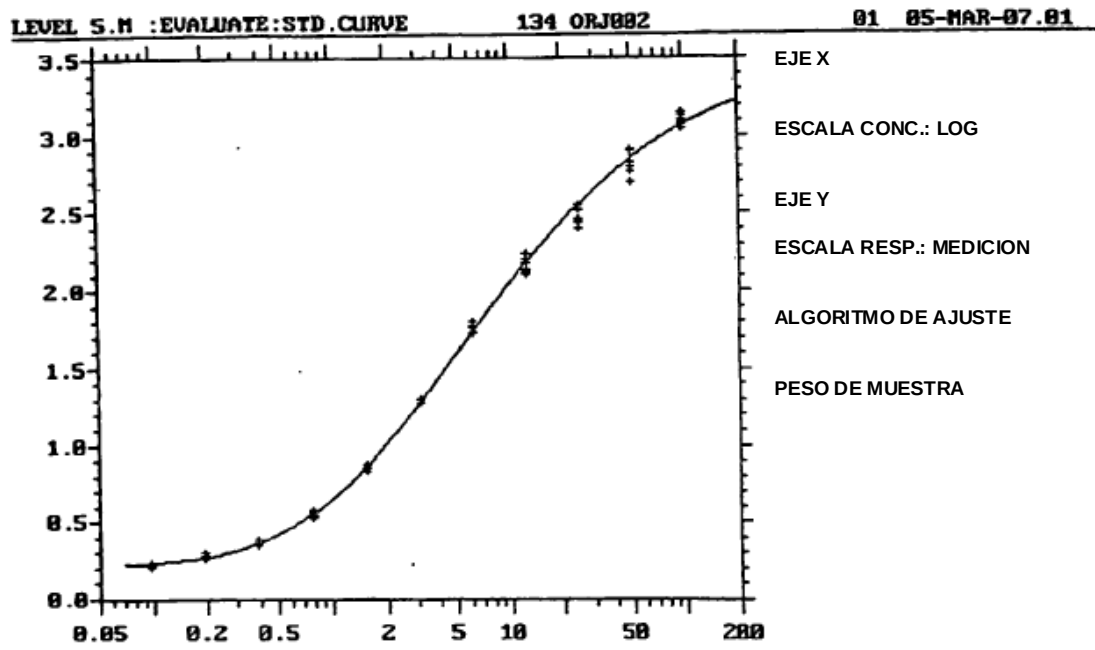


Figura 17

CURVA DE CALIBRACIÓN REPRESENTATIVA ANTI-EGFR

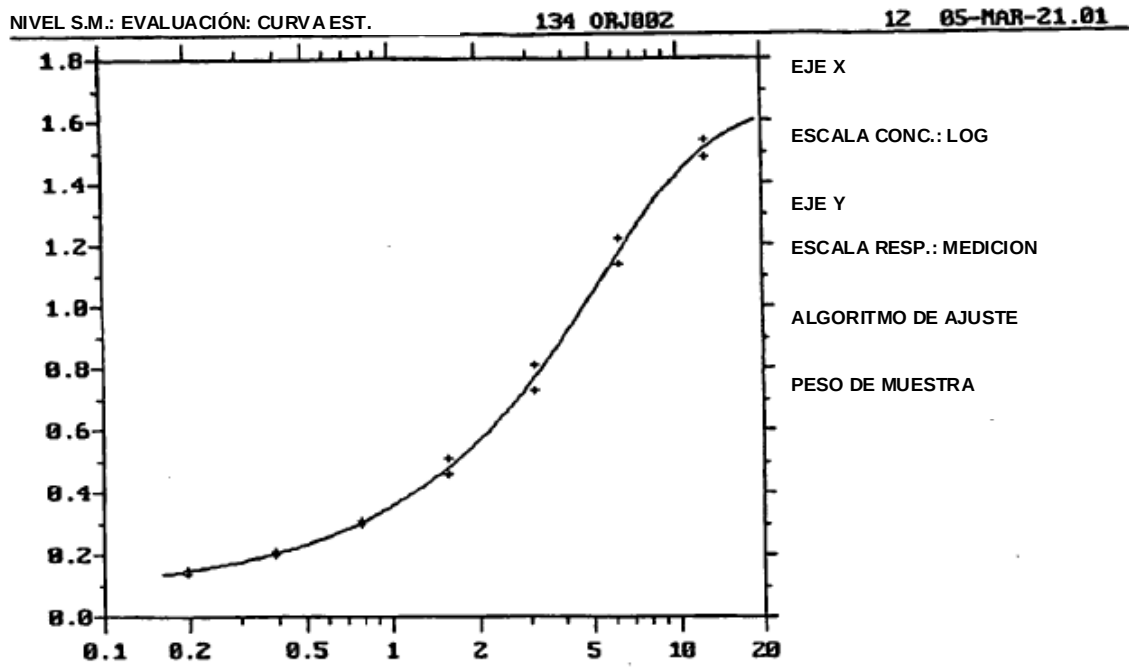


Figura 18

Concentraciones en suero de anti-EGFR el día 1 de la administración intravenosa semanal de anti-EGFR en monos cynomolgus macho

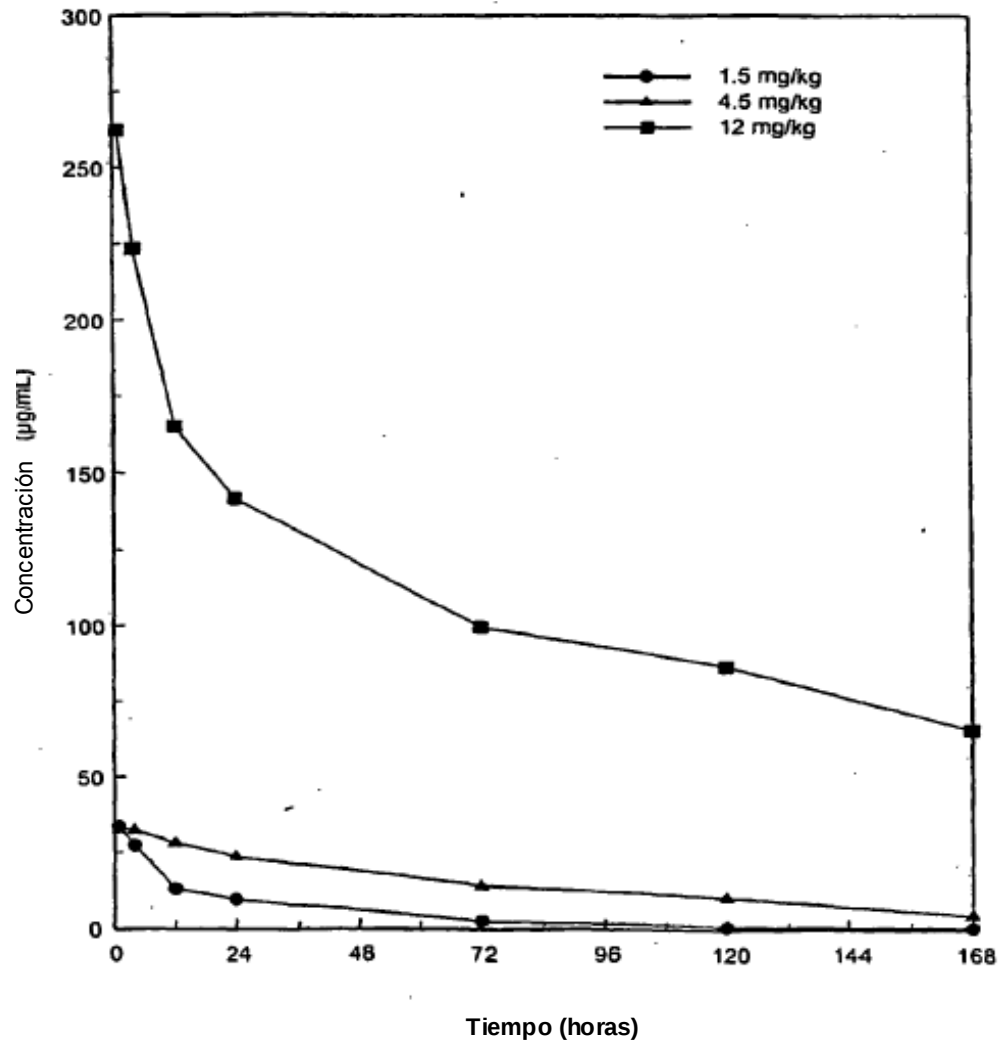


Figura 19

Concentraciones en suero de anti-EGFR el día 1 de la administración intravenosa semanal de anti-EGFR en monos cynomolgus hembra

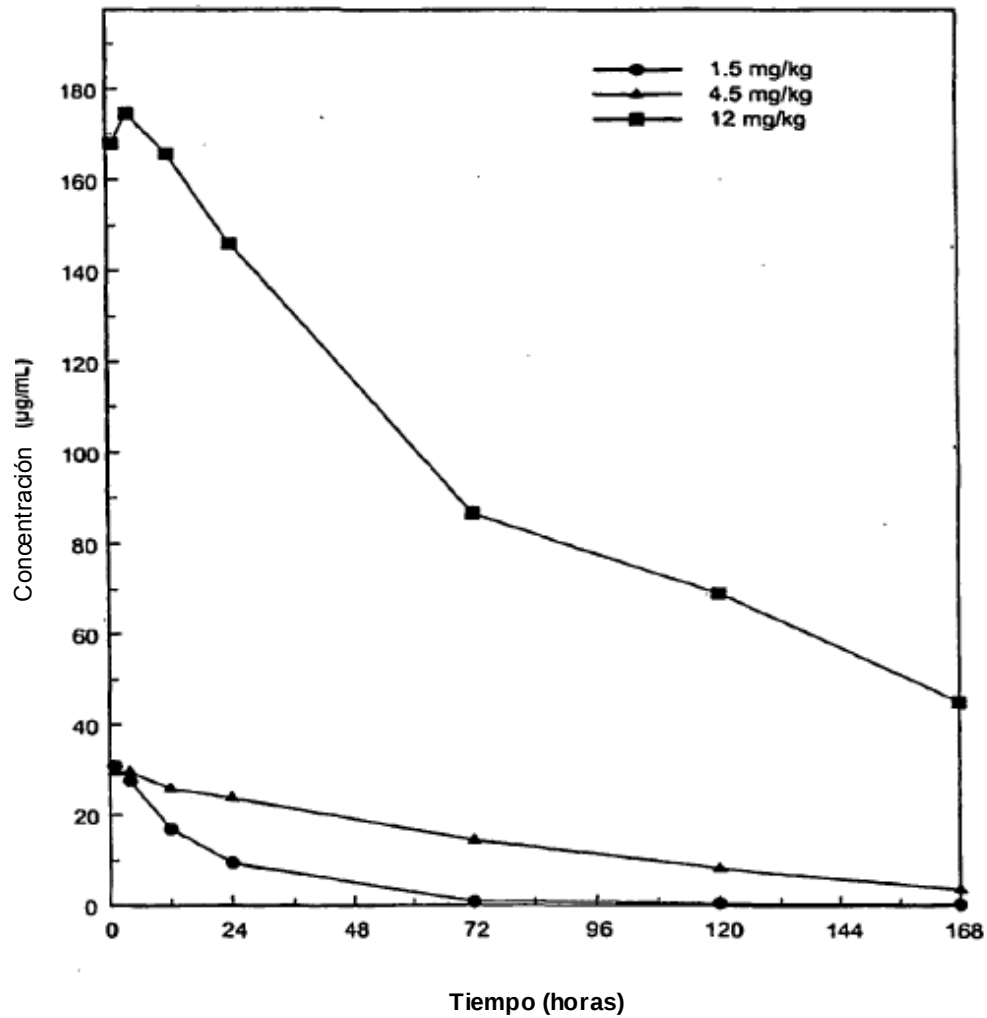


Figura 20

Relación entre las áreas bajo la curva (AUC₁₆₈) de tiempo-concentración de anti-EGFR en suero y nivel de dosis el día 1 de la administración intravenosa semanal de anti-EGFR en monos cynomolgus

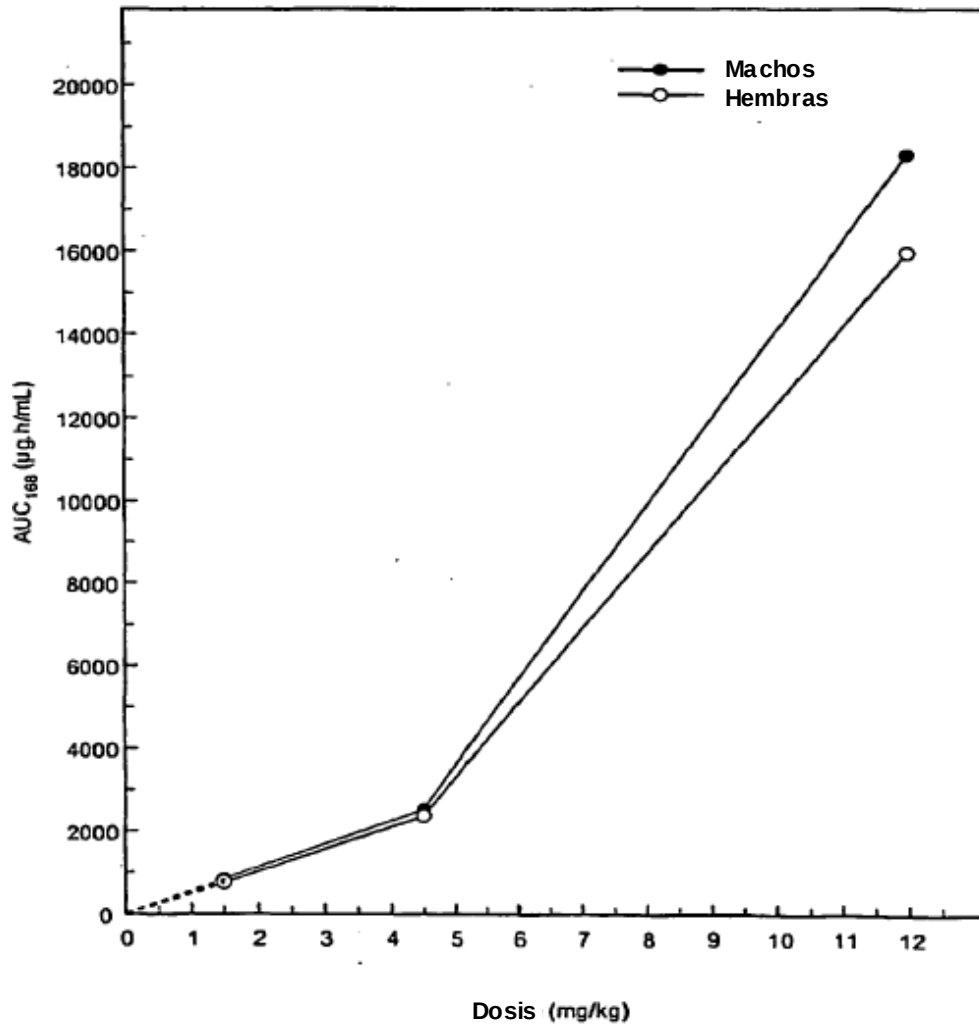


Figura 21

Concentración en suero de anti-EGFR durante la administración intravenosa semanal de anti-EGFR en monos cynomolgus macho

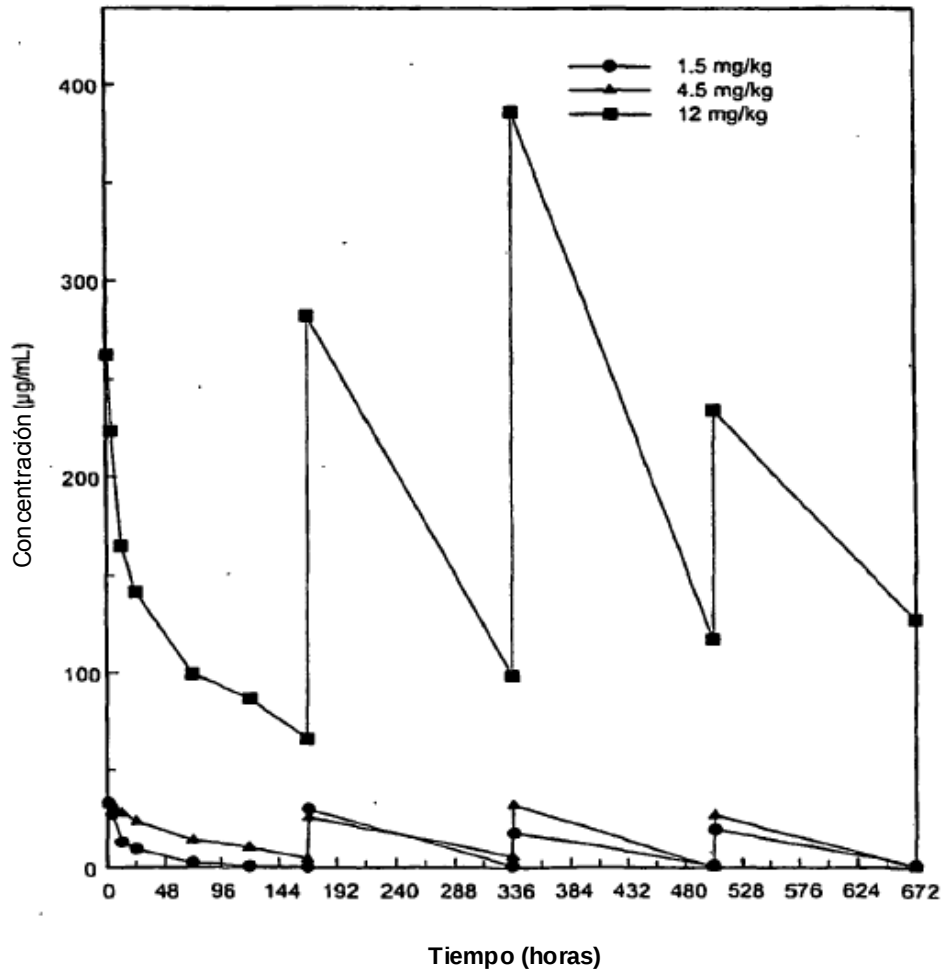


Figura 22

Concentraciones en suero de anti-EGFR durante la administración intravenosa semanal de anti-EGFR en monos cynomolgus hembra

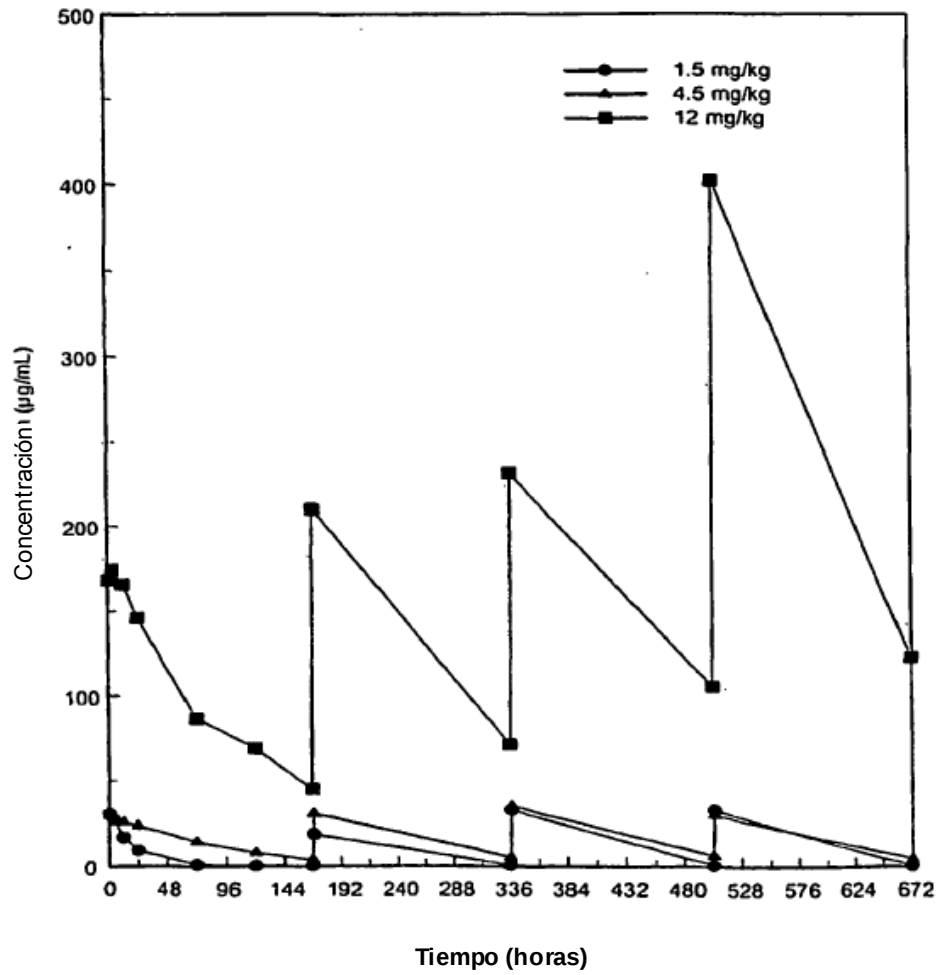


Figura 23

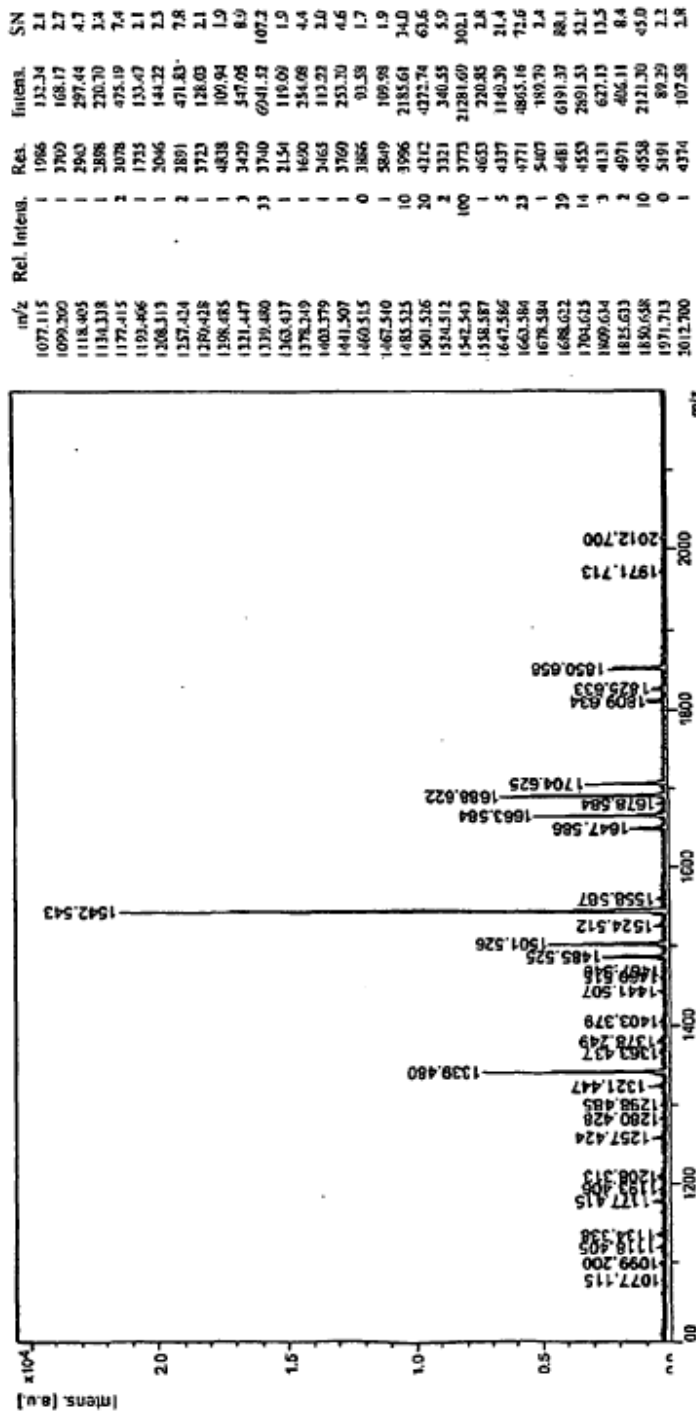


Figura 24

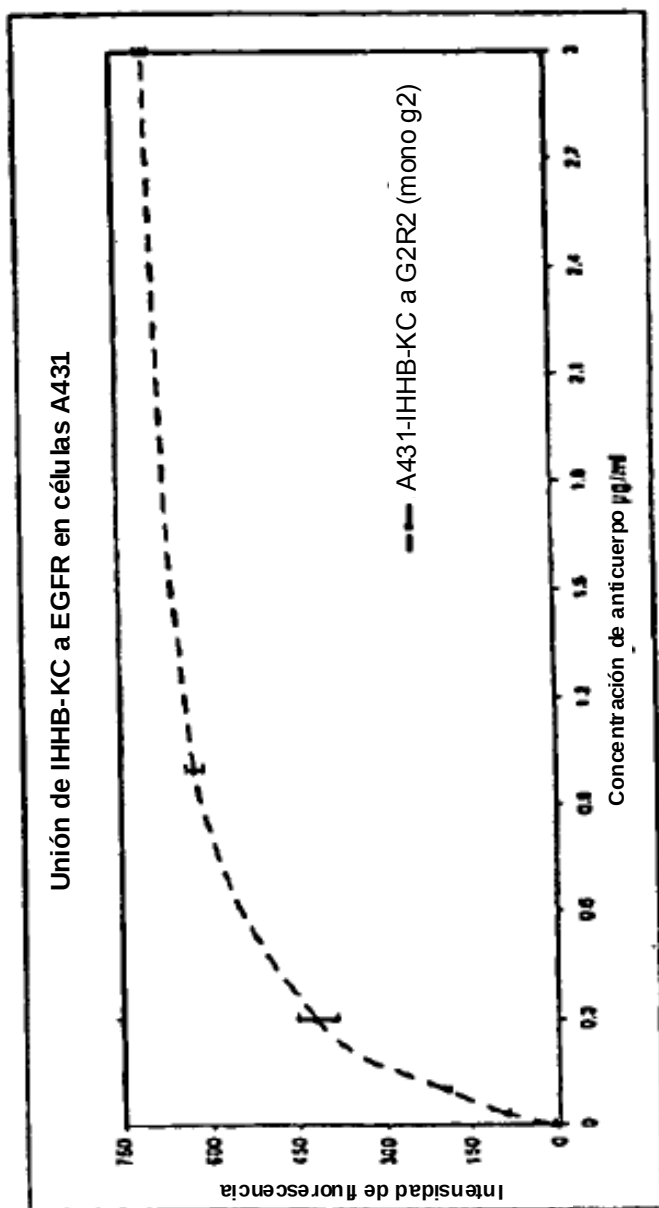


Figura 25

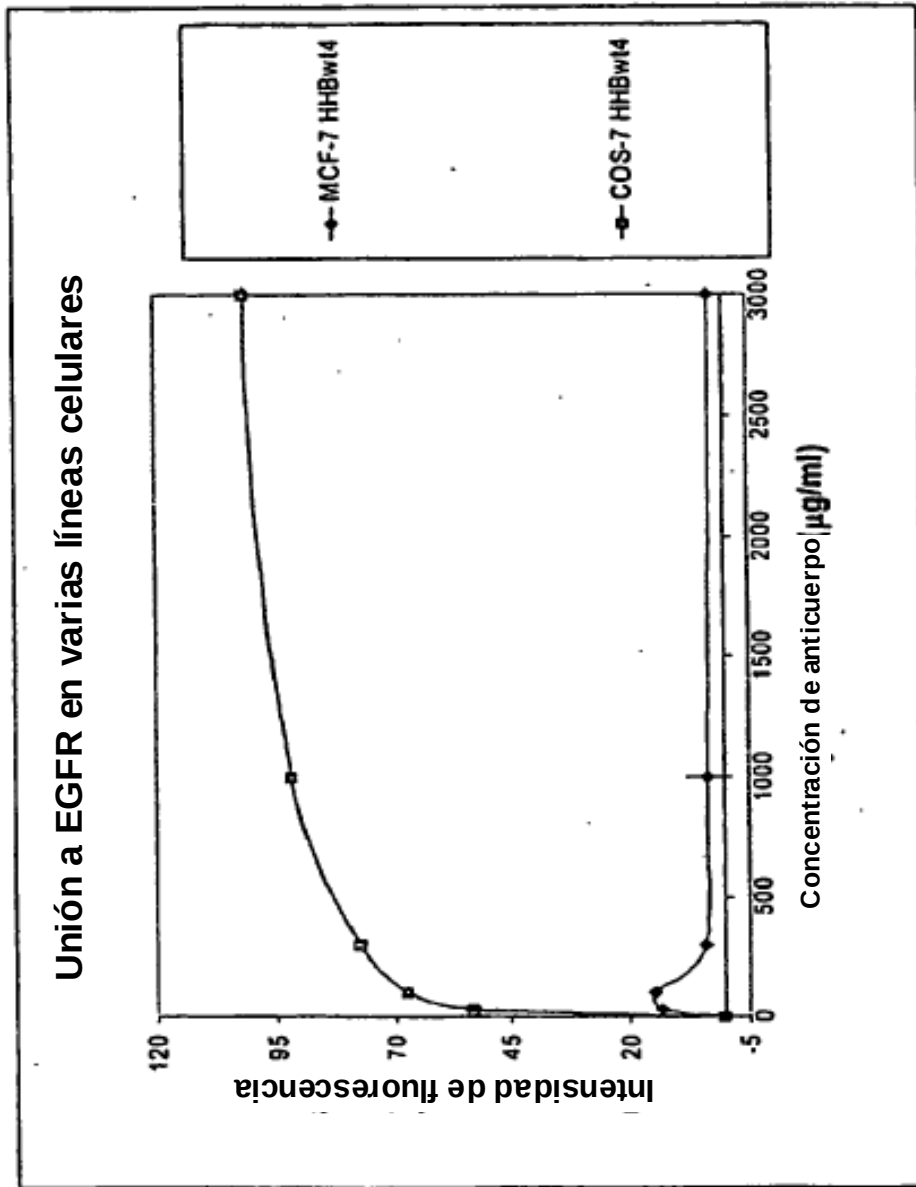


Figura 26

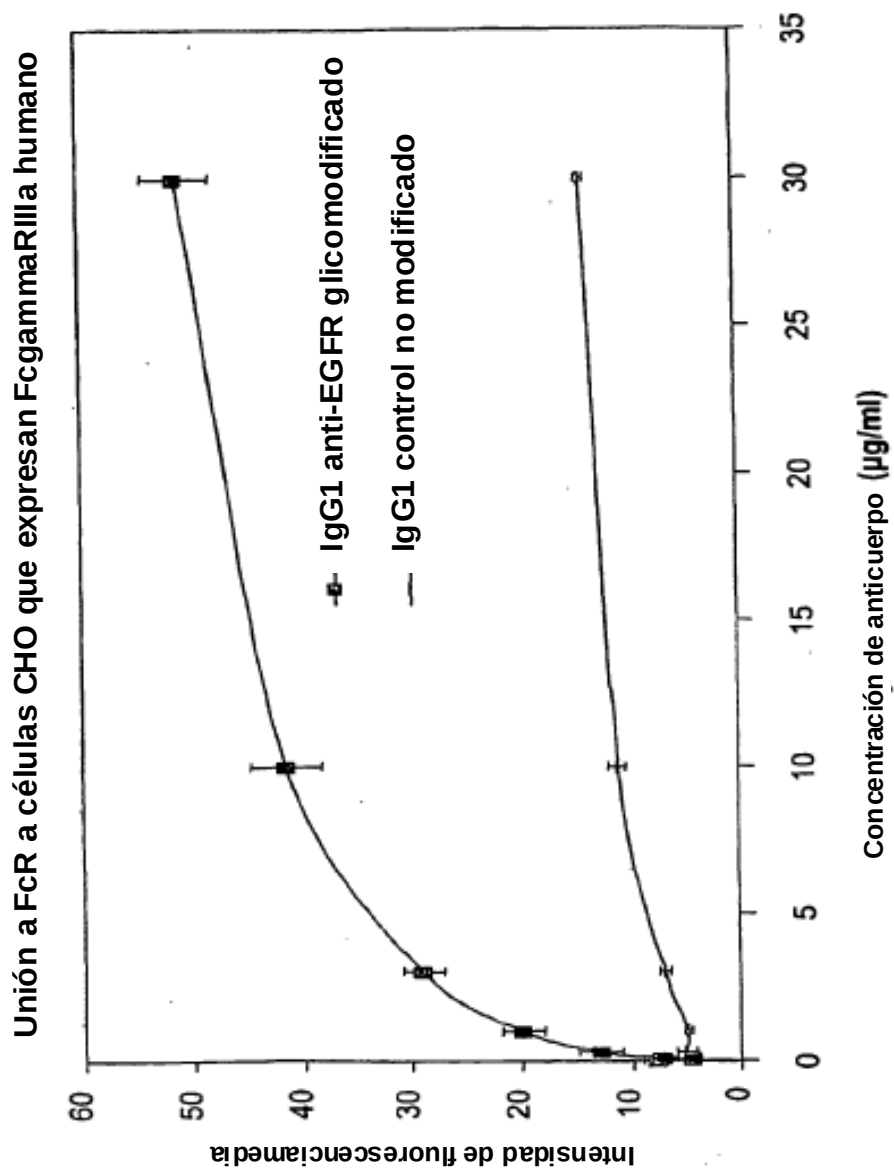


Figura 27

Cuarto ensayo de CCDA utilizando células diana A-549 (T). CCDA medida mediante el método basado en la liberación de LDH. CMSP efectoras € humanas proporción E:T = 25:1

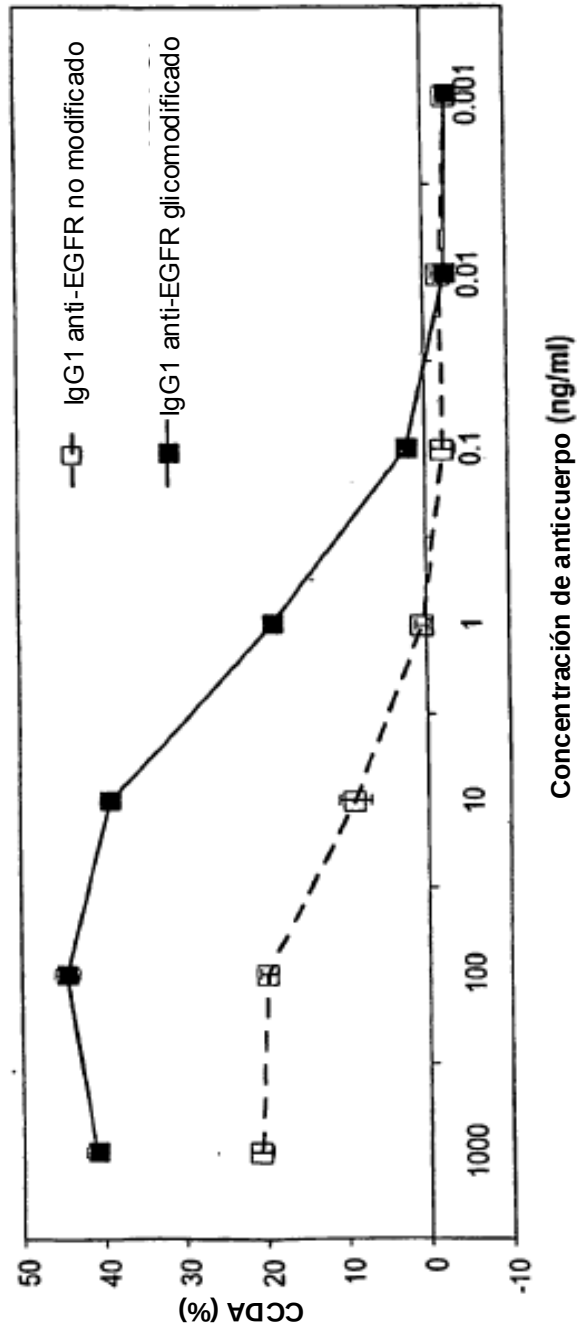


Figura 28

Cuarto ensayo de CCDA utilizando células diana CYNOM-K1 (T).
CCDA medida mediante el método basado en la liberación de
LDH. CMSP efectoras humanas proporción E:T = 25:1

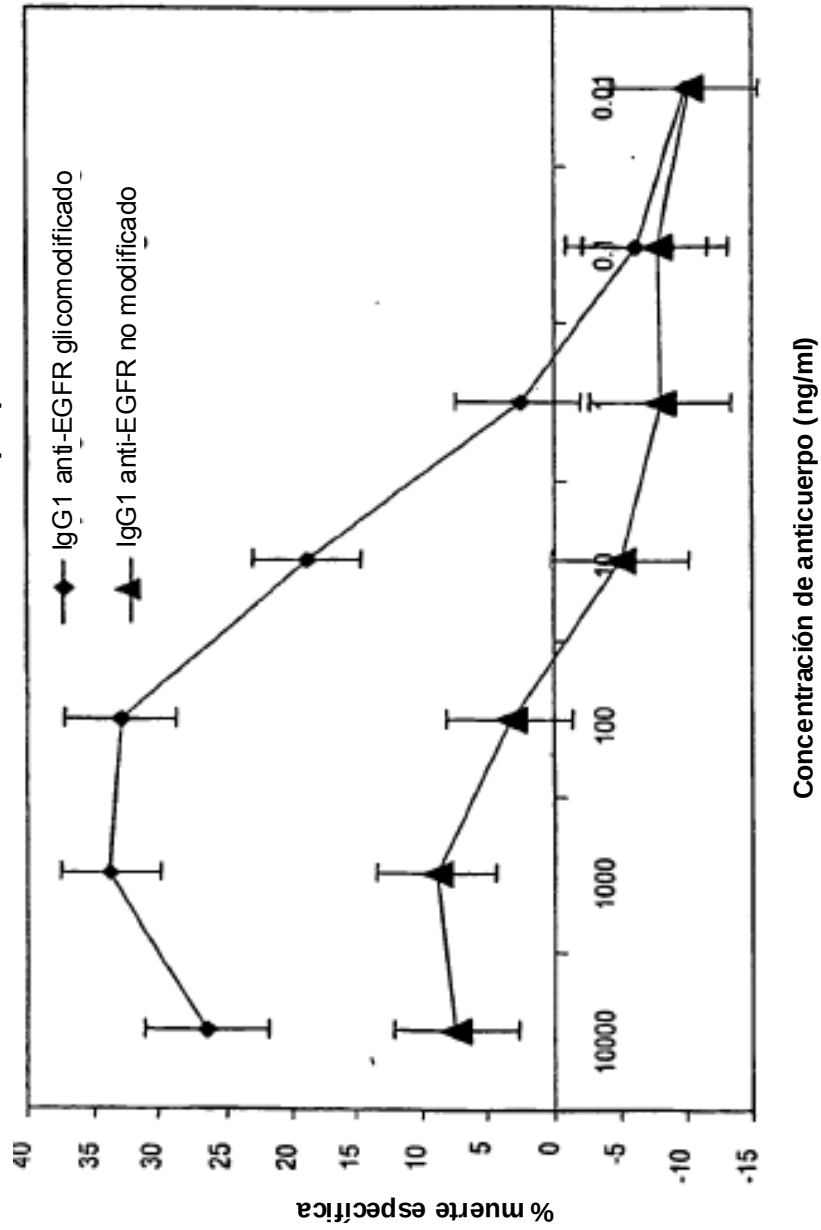


Figura 29

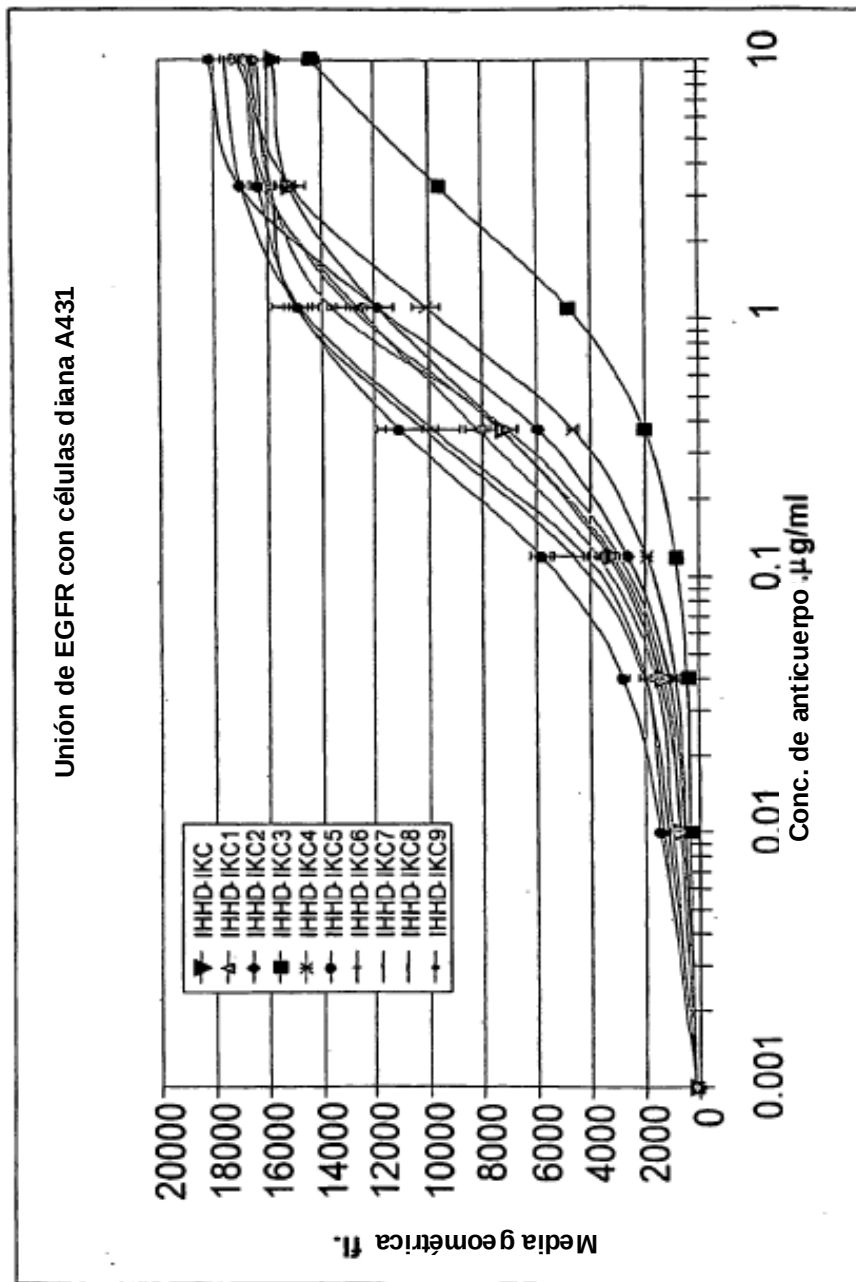


Figura 30

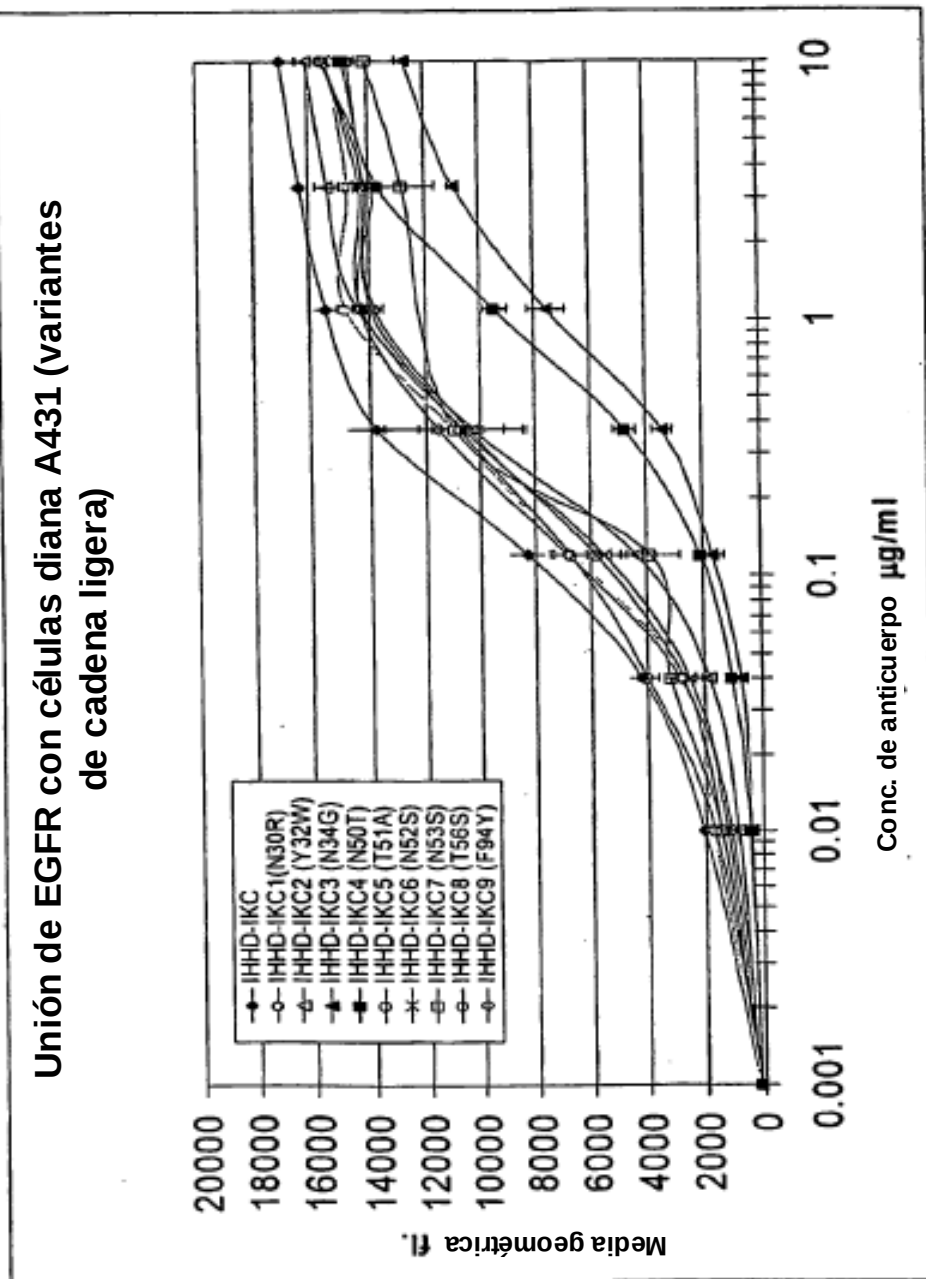


Figura 31

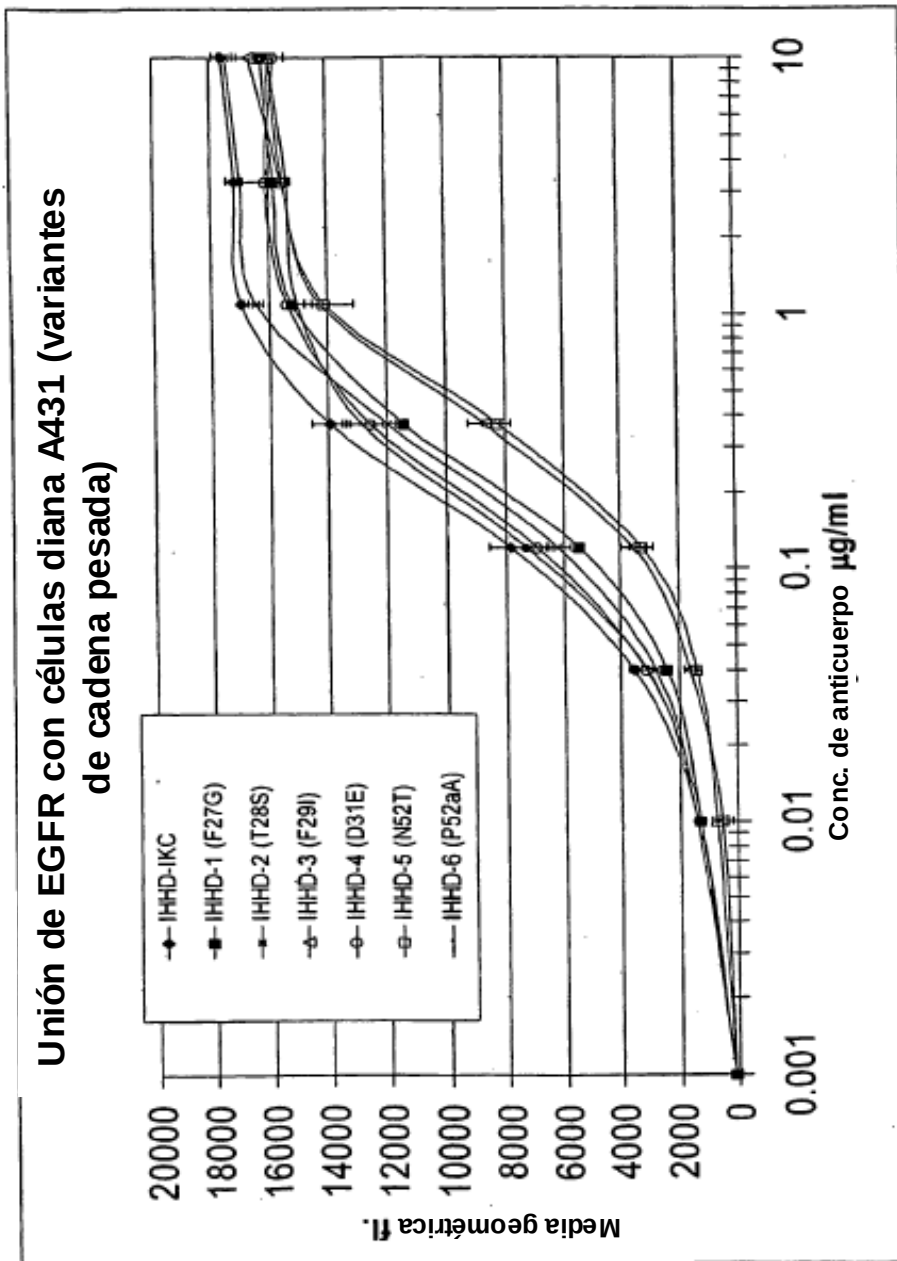


Figura 32

