

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 974**

51 Int. Cl.:

C07K 14/71 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2005** **E 05723258 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015** **EP 1722808**

54 Título: **Péptidos de epítomos del receptor de EGF y usos de los mismos**

30 Prioridad:

20.02.2004 US 546602 P
01.07.2004 US 584623 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.06.2015

73 Titular/es:

**LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH
LTD. (100.0%)
605 Third Avenue
New York, NY 10158, US**

72 Inventor/es:

**JOHNS, TERRANCE GRANT;
SCOTT, ANDREW MARK;
BURGESS, ANTONY WILKS;
OLD, LLOYD J.;
ADAMS, TIMOTHY E.;
WITTRUP, K. DANE;
CHAO, GINGER y
HOYNE, PETER ANTHONY**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 536 974 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

Péptidos de epítomos del receptor de EGF y usos de los mismos.

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere generalmente a péptidos de epítomos del factor de crecimiento, particularmente péptidos de epítomos del receptor de la familia de EGF. La invención también se refiere al uso de los péptidos del receptor en la generación de anticuerpos que tienen actividad anti-tumoral o anti-cancerosa o en la estimulación de una respuesta inmunológica. La invención se refiere adicionalmente a anticuerpos dirigidos específicamente contra los péptidos del receptor.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 [0002] *Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el EGFR de2-7 como dianas para terapia.* El tratamiento inmunoterapéutico del cáncer tiene la ventaja sobre las terapias tradicionales, tales como cirugía, radioterapia y quimioterapia, de que puede haber una alta especificidad para la enfermedad diana. Pueden usarse mAb específicos de tumor para marcar células cancerosas, creando la necesidad de identificar y localizar antígenos asociados a tumor como dianas potenciales. La sobreexpresión de los receptores del factor de crecimiento, tales como EGFR, el receptor de IL-2 y p185 HER2 a menudo se asocia a tumores, tales como tumores de pulmón, mama, cabeza y cuello y ovario.

[0003] El EGFR pertenece a una familia de proteínas de receptores del factor de crecimiento de tirosina cinasa. Durante mucho tiempo, el EGFR ha sido objeto de investigación, y recientemente se han realizado estudios de determinación de estructura exitosos de los dominios extracelulares (Ogiso H y col. Cell 2002, 110: 775-787; Garrett TP y col. Cell 2002, 110:763-773; Ferguson KM y col. Cell 2003, 11: 507) y el dominio de cinasa intracelular (Stamos J y col. J.Biol.Chem. 2002, 277: 46265-46272). Esto ha proporcionado información vital para el comportamiento del receptor y sus ligandos. El EGFR es una molécula asociada a la superficie celular, que se activa a través de la unión de un ligando altamente específica, tal como EGF y el factor de crecimiento transformante alfa (TGF α). Después de la unión del ligando, el receptor dimeriza, lo que se traduce en la fosforilación de la región de la tirosina cinasa intracelular. Esto conduce a una señalización en la dirección 3', activando una cascada de respuestas que da lugar al crecimiento y la proliferación celular. Dado que las células tumorales, a diferencia de las células normales, son dependientes del EGFR para realizar su función, y debido a la gama de posibilidades de inhibir el control regulador del EGFR de la proliferación y la diferenciación en las células, el receptor es una diana común para terapia. El EGFR normalmente se expresa en el hígado y la piel, encontrando a menudo un aumento de la actividad en los tumores sólidos, tales como tumores de cabeza y el cuello, colorrectal, páncreas, glioma, vejiga y pulmón, por lo que es un marcador pronóstico útil. A menudo, la sobreexpresión del EGFR se acompaña por un aumento de la producción de TGF α lo que supone una ventaja sobre el crecimiento del bucle autocrino con respecto al tumor. Además, se descubrió que la amplificación génica de *EGFR* y la transposición Curtius que se observa en algunos tumores, a menudo se asocia con la aparición de formas mutantes del EGFR (Libermann TA, y col. Nature 1985, 313: 144-147; Wong AJ, Proc Natl Acad Sci USA 1992, 89: 2965-2969; Frederick L, y col. Cancer Res 2000, 60: 1383-1387). Uno de los mutantes más comunes es la variante EGFR (EGFRvIII o de2-7EGFR). El de2-7EGFR tiene una delección en el mismo marco de lectura de 801 pares de base, correspondiente a una sobreexpresión de exones faltantes de transcripciones 2-7, y una delección dimensionable de los restos aminoacídicos 6-273 en el dominio extracelular, con una glicina novedosa insertada en el sitio de empalme (Wong AJ y col. Proc Natl Acad Sci USA 1992, 89: 2965-2969; Sugawa N. y col. Proc Natl Acad Sci USA 1990, 87: 8602-8606; Yamazaki H. y col. Jpn J Cancer Res 1990, 81: 773-779; Ekstrand AJ y col. Proc Natl Acad Sci USA 1992, 89: 4309-4313). Esta forma truncada del EGFR no depende de la unión de ligando, y es constitutivamente activa. El de2-7EGFR se expresa en una fracción grande (>50%) de gliomas malignos y también existen informes que vinculan el de2-7EGFR con carcinomas de mama (27%), ovario, próstata y pulmón (17%) (Wong AJ, y col. Proc Natl Acad Sci USA 1992, 89: 2965-2969; Garcia dP y col. Cancer Res 1993, 53: 3217-3220; Wikstrand CJ y col. Cancer Res 1995, 55: 3140-3148; Moscatello DK y col. Cancer Res 1995, 55: 5536-5539).

Anticuerpos Anti-EGFR

55 [0004] Muchos estudios se han centrado en la producción de anticuerpos para la región extracelular del EGFR. Los mAb generados median su actividad antitumoral principalmente mediante el bloqueo de la unión del ligando y también la interrupción de la señalización. Se desarrollaron inicialmente varios mAb por Peng y col. 1996 (Peng D y col. Cancer Res 1996, 56: 3666-3669) y Mendelson y col. 1997 (Mendelsohn J Clin Cancer Res 1997, 3: 2703-2707)

- para reconocer específicamente el EGFR. Se usaron los Mab 425, 528 IgG2a y 225 IgG1 para tratar pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Sturgis EM, y col. *Otolaryngol. Head Neck Surg* 1994, 111: 633-643). El trabajo experimental, incluyendo el radiomarcado, ha demostrado que el mAb 425 es un inhibidor eficaz del crecimiento tumoral, incluyendo los gliomas (Rodeck U y col. *J Cell Biochem* 1987, 35: 315-320; Brady LW y col. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991, 22: 225-230; Faillot T y col. *Neurosurgery* 1996, 39: 478-483). El IMC-C225 mAb reconoce específicamente el EGFR, y tiene mucho potencial en el tratamiento de cánceres, tales como de cabeza y cuello, colorrectal, páncreas y pulmón. El mAb255 regula a la alza p27 K1P1 e induce el arresto de G1 en una línea celular de cáncer de próstata. Posteriormente, se desarrolló una versión quimérica (ERBITUX™ (Imclone Systems, NY) IMC-C225) del anticuerpo 225 de ratón para extender su capacidad terapéutica. El IMC-C225 ha aumentado la afinidad de unión para el EGFR y es más eficaz en la reducción del crecimiento de xenoinjerto en ratones. Tanto los anticuerpos de ratón como quiméricos son incluso más eficaces cuando se dan en terapia de combinación con radiación (Robert F y col. *J Clin Oncol* 2001, 19: 3234-3243) o quimioterapia (Shin DM y col. *Clin. Cancer Res* 2001, 7: 1204-1213). El mecanismo terapéutico de acción del IMC-C225 parece incluir una función de bloqueo de receptor eficiente y una capacidad para ADCC. El IMC-225 puede reducir el tamaño tumoral en los pacientes. Se requieren grandes dosis de IMC-C225 para saturar los sitios de unión al hígado y la piel y los efectos adversos son principalmente erupción en forma de acné y prurito. Los ensayos clínicos han demostrado tasas de respuesta parciales del crecimiento tumoral en pacientes de entre el 11% y el 22% cuando se combinan con cisplatino. El progreso preclínico y clínico de este anticuerpo se contempla en revisiones de Baselga y col. [49] y Mendelsohn y col. (Baselga J y col. *J Clin Oncol* 2000, 18: 904-914; Mendelsohn J *J.Clin.Oncol.* 2002, 20 Suppl 1: 1S-13S).
- [0005]** El mAb R3 se alzó contra el EGFR y se desarrolló inicialmente para su uso en radioinmunoterapia (Waterfield MD, y col. *J.Cell Biochem.* 1982, 20: 149-161; Ramos-Suzarte M, y col. *J. Nucl. Med.* 1999, 40: 768-775). Tanto la forma quimérica como humanizada de R3 se han producido y se han ensayado en monos y en ratones. La versión humanizada de R3 conservó la misma afinidad de unión del anticuerpo de ratón, y se descubrió que era 2 veces menos inmunogénico que el anticuerpo quimérico. Los estudios preclínicos de xenoinjertos en ratones usando mAb humanizados de ratón marcados con tecnecio mostraron un mayor potencial como herramienta diagnóstica con la versión humanizada que los murinos. El mAb anti-EGFR de rata, ICR62, compite de forma eficaz para la unión de ligando y erradica los xenoinjertos de tumor humano (carcinomas de células escamosas) en ratones. Los ensayos clínicos en fase I informaron de que el anticuerpo se administró con seguridad a pacientes con carcinomas de células escamosas, y esto se ha usado desde entonces para investigar las vías de señalización de los receptores del factor de crecimiento y sus ligandos en líneas celulares de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (O-charoenrat P y col. *Clin. Exp. Metastasis* 2000, 18: 155-161; O-charoenrat P y col. *Int. J. Cancer* 2000, 86: 307-317; O-charoenrat P y col. *Oral Oncol.* 2002, 38: 627-640).
- [0006]** El mAb 108.4 anti-EGFR mostró un efecto anti-tumoral que se mejoró cuando se combinó con cisplatino (Aboud-Piralc E y col. *J Natl Cancer Inst* 1988, 80: 1605-1611). Se produjo el mismo resultado con el fragmento Fab en solitario, lo que sugiere que el mecanismo no depende de la interacción del Fc con el sistema de complemento huésped. En otro ejemplo, el potencial de la terapia de combinación se investigó con el mAb RG 83852, con respecto al entendimiento del mecanismo subyacente entre el anticuerpo y el receptor (Perez-Soler R y col. *J Chin Oncol* 1994, 12: 730-739). Se sugirió que la regulación al alza del EGFR por mAb RG 83852 aumentó la actividad de la tirosina cinasa del receptor en el tumor, aumentando de este modo su susceptibilidad a la quimioterapia. La irradiación dirigida por los anticuerpos monoclonales es otro enfoque para el tratamiento del cáncer. Se han realizado varios estudios sobre el efecto de radiomarcas varios anticuerpos anti-EGFR en el tratamiento del glioma por Kalofonos (Kalofonos HP y col. *J Nucl.Med* 1989, 30:1636-1645). Estos estudios informaron de un buen direccionamiento y mínima toxicidad. El mAb EMD 72000 humanizado que bloquea la unión de ligando en el EGFR se está sometiendo actualmente a ensayos clínicos (Bier H y col. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2001, 47: 519-524). Por último, el anticuerpo completamente humano ABX-EGF obtenido a partir de ratones transgénicos también dirige de forma eficaz el EGFR (Yang XD y col. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2001, 38: 17-23).
- 50 Anticuerpos Anti de2-7 EGFR**
- [0007]** El EGFR de tipo salvaje se expresa en la mayor parte de las células epiteliales; por lo que un inconveniente para el direccionamiento terapéutico del receptor es el efecto secundario de toxicidad para un tejido normal, así como las células cancerosas. Además, dichos anticuerpos cuando se conjugan con radio-isótopos o agentes citotóxicos pueden causar un daño potencial al tejido normal. De forma ideal sería ventajoso dirigir preferencialmente el EGFR sobre las células cancerosas. El de2-7EGFR es una diana terapéutica atractiva porque es altamente específica en adultos para las células cancerosas. Se han realizado estudios con anticuerpos contra el de2-7EGFR donde se ha demostrado la inhibición del crecimiento celular en líneas celulares cancerosas. Los mAb 528 (Sturgis EM y col. *Otolaryngol.Head Neck Surg* 1994, 111: 633-643; Masui H y col. *Cancer Res* 1984, 44: 1002-1007) y 425

(que se ha descrito anteriormente) se unen tanto al de2-7EGFR como al EGFR. La secuencia única del de2-7EGFR generado por la inserción de una glicina en el sitio de empalme, crea un epítipo novedoso, situado cerca del extremo N-terminal de la región extracelular (Humphrey PA y col. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 4207-4211; Lorimer IA y col. *Clin Cancer Res* 1995, 1: 859-864). Se han producido varios anticuerpos específicos para la unión por fusión, incluyendo mAb Y10 (Wikstrand CJ y col. *Cancer Res.* 1995, 55: 3140-3148; Okamoto S y col. *Br.J Cancer* 1996, 73: 1366-1372; Sampson JH y col. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97: 7503-7508). Este anticuerpo, que se usó de forma eficaz para tratar xenoinjertos de tumor cerebral en ratones, funciona mecánicamente reduciendo el crecimiento celular, y también demostró capacidad para ADCC y CDC. Los anticuerpos generados contra péptidos de la secuencia específica para la unión de fusión incluyen el MR1, un fragmento Fv generado por la presentación de fagos (Lorimer IA y col. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93: 14815-14820). El Fv tiene la capacidad de infiltrarse en los tumores sólidos y se ha usado para entregar una inmunotoxina. Se han radiomarcado varios anticuerpos dirigidos a la unión de fusión de de2-7EGFR: Estos incluyen L8A4, DH8.3 y Ua30:2 (Reist CJ y col. *Cancer Res* 1997 57: 1510-1515; Hills D y col. *Int J Cancer* 1995, 63: 537-543; Ohman L y col. *Tumour Biol* 2002, 23: 61-69). El anticuerpo DH8.3 radiomarcado reconoce el de2-7EGFR, pero no el EGFR normal, y reduce el tamaño tumoral en ratones sin pelo. El documento WO 03/014159 A describe procedimientos de cribado para compuestos que inhiben la formación de dímeros de receptor activos basados en la estructura cristalina de EGFR.

El anticuerpo anti-EGFR murino mAb-806

[0008] Se ha demostrado que el anticuerpo monoclonal murino mAb-806 (clase IgG2b) se une al de2-7EGFR, pero no al EGFR expresado normalmente de tipo salvaje (Johns TG y col. *Int J Cancer* 2002, 98: 398-408). Aunque mAb-806 no reacciona con el receptor de tipo salvaje normal, reconoce una proporción (~10%) de EGFR de tipo salvaje en las células tumorales que contienen genes *EGFR* amplificados (Johns TG y col. *Int J Cancer* 2002, 98: 398-408; Luwor RB y col. *Cancer Res.* 2001, 61: 5355-5361). La capacidad de mAb-806 de marcar tanto de2-7EGFR como el EGFR de tipo salvaje amplificado, ambos de los cuales se producen con una frecuencia notable en los tumores, debe conferir mayor eficacia para mAb-806 como un agente terapéutico.

[0009] MAb-806 difiere de otros anticuerpos que marcan el de2-7EGFR, en que no reconoce la unión de fusión única de de2-7EGFR (Wong AJ, y col. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89: 2965-2969; Sugawa N. y col. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 8602-8606; Yamazaki H, y col. *Jpn.J Cancer Res* 1990, 81: 773-779; Ekstrand AJ, y col. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89: 4309-4313). El epítipo de unión de mAb-806 existe tanto en el de2-7EGFR de tipo salvaje como truncado. Dada la capacidad de mAb-806 para unirse tanto al de2-7EGFR como al EGFR amplificado, y su ausencia de unión a un receptor de tipo salvaje expresado normalmente, se ha asumido que el epítipo es dependiente conformacionalmente. Muchos anticuerpos contra el EGFR de tipo salvaje en el desarrollo clínico tienen la función de bloquear la unión de ligando. Este no parece ser el mecanismo de acción de mAb-806 debido a las características de unión tanto con el de2-7EGFR de unión de no ligando como el EGFR amplificado, y la ausencia de unión con el receptor normal. Esto indica que mAb-806 no interfiere con la unión de ligando o la dimerización.

[0010] El anticuerpo mAb-806 se une al de2-7EGFR expresado en la línea celular U87MG.de2-7EGFR, pero no a la línea celular parental (U87MG) que contiene EGFR de tipo salvaje no amplificado. En comparación con la eficacia del mAb-806 con el DH8.3 mAb, se estableció que mAb-806 era más eficiente en el direccionamiento tumoral, y tenía una unión más fuerte que el DH8.3 (EGFR (Johns TG y col. *Int J Cancer* 2002, 98: 398-408). Se demostró que el mAb-806 inhibía el crecimiento de xenoinjertos de ratones de manera dependiente de la dosis usando la línea celular A431 que contenía EGFR amplificado (Johns TG y col. *Int J Cancer* 2002, 98: 398-408), así como U87MG.de2-7EGFR. De nuevo, no se observó inhibición del crecimiento en los xenoinjertos U87MG parentales. Significativamente, también se ha mostrado una reducción del crecimiento tumoral para glioblastomas xenoinjertados intracraneales tras la aplicación de mAb-806 a xenoinjertos U87MG.de2-7EGFR, LN-Z308, de2-7EGFR y A1207.de2-7EGFR (todos expresan de2-7EGFR) (Mishima K y col. *Cancer Res.* 2001, 61: 5349-5354). No se observó una inhibición significativa en los xenoinjertos de los tumores U87MG parentales, los tumores U87MG.DK (que expresan de2-7EGFR deficiente en cinasa), y únicamente se produce una pequeña respuesta en el glioma U87MG. Se produce una reducción en la angiogénesis y un aumento en la apoptosis concurrentemente con la reducción del crecimiento tumoral.

[0011] Con sus propiedades únicas, el anticuerpo mAb-806 es un producto terapéutico prometedor para el tratamiento de cánceres tales como cáncer de cabeza y cuello y glioma. El desarrollo de una forma humanizada de mAb-806 tendrá un mayor efecto sobre su eficacia. Tal anticuerpo debe evitar una respuesta HAMA, mejorar su capacidad para reclutar una función efectora y aumentar su semivida en circulación, potenciando de este modo en gran medida sus perspectivas clínicas.

[0012] Inicialmente hubo altas expectativas para el uso de mAbs como balas mágicas terapéuticas, pero pronto se hizo evidente que hay varios obstáculos importantes que limitan el uso clínico de anticuerpos no humanos. La administración de dosis múltiples de mAbs no humanos generalmente provoca una respuesta inmune no deseada que limita severamente su uso como un producto terapéutico. El anticuerpo de ratón se reconoce por el sistema inmune humano como una proteína extraña, dando como resultado un efecto inmune conocido como la respuesta de anticuerpo humano anti-ratón, es decir, la respuesta HAMA. La respuesta HAMA puede dar como resultado la neutralización de la función del anticuerpo y graves reacciones de tipo alérgico.

10 [0013] Gran parte de la respuesta de HAMA se dirige contra la parte de unión del antígeno (Fab) y raramente contra las regiones constantes (Fc) del anticuerpo. Problemas adicionales resultantes de la aplicación clínica de mAbs de roedores se asocian a las regiones de Fc. El Fc humano se une a los receptores Fc especializados, lo que ayuda a mantener los anticuerpos en la circulación. Como resultado, los mAbs de roedores tienen una semivida acortada, generalmente de 1 a 3 días en comparación con una semana o más para Ig humana. Otra limitación es la reclutación reducida de una diversidad de funciones efectoras iniciadas en la unión del Fc al receptor Fc humano. La unión a los receptores Fc de las células efectoras especializadas, tales como macrófagos, monocitos y neutrófilos, activa el sistema inmune conduciendo a una respuesta conocida como citólisis mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC). Los receptores Fc también son responsables de la activación de la cascada del complemento (un grupo de proteínas interactuantes) lo que conduce a la respuesta de la citólisis dependiente de complemento (CDC). Esto da como resultado la lisis celular y aumenta la eficacia de los anticuerpos para combatir las infecciones bacterianas. La clase de los dominios constantes controla de predominantemente la eficacia del anticuerpo en la lisis celular.

[0014] Existen diferentes enfoques que se pueden adoptar para superar la inmunogenicidad de los mAb de ratón, tales como la infusión rápida de dosis del anticuerpo y la utilización de fragmentos de anticuerpos (por ejemplo Fv monocatenario (scFv), véase Carter P Nat. Rev. Cancer 2001, 1: 118-129; Hudson P y col. Nature Med 2003, 9: 129-134 y referencias en los mismos). Como alternativa, se han empleado procedimientos de ingeniería de anticuerpos para reducir la respuesta HAMA cuando las IgG enteras se usan para la terapia. Este enfoque tiene las ventajas potenciales añadidas de aumentar la semivida y un reclutamiento más eficaz de la función efectora. Dichos procedimientos de humanización se conocen bien en la técnica y se han descrito, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.225.539, 5.530.101, 5.585.089, 5.859.205 y 6.797.492. El anticuerpo mAb-806 y anticuerpos quiméricos del mismo se describen en el documento WO 02/092771.

Anticuerpos Humanos

35 [0015] Un enfoque alternativo para superar el problema de la inmunogenicidad en los mAb es la producción de anticuerpos completamente (totalmente) humanos. Puede usarse la tecnología de presentación en fagos para seleccionar una gama de anticuerpos humanos que se unan específicamente al antígeno usando procedimientos de enriquecimiento de afinidad (McCafferty J y col. Nature 1990, 348: 552-554; Azzazy HM y col. Clin. Biochem. 2002, 35: 425-445). El bacteriófago es un virus que infecta únicamente bacterias, y se reproduce en *Escherichia coli*. El proceso de presentación en fagos implica la inserción de material genético humano en el genoma del fago. El sistema de fagos filamentosos tiene la única propiedad de que la información estructural y funcional del ligando presente en la superficie del fago (fenotipo) se une a la información genética del ligando en el genoma del fago (genotipo). Por lo tanto, puede generarse una biblioteca de moléculas Ig y mostrarse en la superficie del fago filamentoso, y se seleccionan los que muestren afinidades de unión. Este procedimiento tiene la ventaja de realizar un cribado simultáneo muy rápido de muchos anticuerpos con alta afinidad a antígeno. También se ha usado con éxito en humanizaciones de anticuerpos generando una biblioteca combinatoria que incluye un conjunto de restos potencialmente críticos necesarios para conservar la aidez de unión completa. Después, el marco puede optimizarse por mutagénesis al azar de los restos críticos.

Ratones transgénicos

[0016] Recientemente, se desarrolló un enfoque alternativo a la metodología de presentación en fagos de producción de mAbs humanos donde los genes humanos se insertan en el ADN de ratón creando ratones transgénicos, capaces de generar las secuencias de proteínas completamente humanas (para revisiones de los procedimientos implicados, véanse las referencias LittleM y col. Immunol. Today 2000, 21: 364-370; Humphreys DP y col. Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 2001, 4: 172-185; Ishida T y col. Nippon Rinsho 2002, 60: 439-444). En consecuencia, estos ratones pueden producir anticuerpos humanos en respuesta a la inmunización con un antígeno diana. Los anticuerpos generados son efectivamente humanos y no se espera que sean rechazados por el sistema

inmune del huésped. El XenoMouse® producido por Abgenix contiene aproximadamente el 80% de los genes de cadena pesada humanos, y un gran número de genes de cadena ligera. Se han producido diferentes cepas de los ratones que contienen diferentes clases de anticuerpos capaces de dirigirse a una variedad de enfermedades (Yang XD y col. Cancer Res 1999, 59: 1236-1243; Davis CG y col. Cancer Metastasis Rev 1999, 18: 421-425). Por ejemplo, ABX-MA1 es un anticuerpo completamente humano que se dirige a MCAM/MUC18 (una glicoproteína asociada a espesor tumoral y la metástasis en células de melanoma humano en ratones) y se muestra prometedor en el tratamiento del melanoma (Mills L y col. Cancer Res 2002, 62: 5106-5114). ABX-EGF se dirige al EGFR, y actualmente esta en ensayo clínico de fase I/II en el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de pulmón de células no pequeñas y cáncer de colon.

[0017] Por lo tanto, en vista de las deficiencias que se han mencionado anteriormente en relación con procedimientos de la técnica anterior y el reconocimiento de la utilidad y la aplicación de anticuerpos en el diagnóstico, tratamiento y prevención de la enfermedad, será evidente que todavía existe la necesidad en el técnico de una preparación y uso de anticuerpos humanizados/totalmente humanos, especialmente dirigidos contra el receptor de EGF. Existe una necesidad particular de anticuerpos humanizado/completamente humanos que demuestren una disminución o ausencia de la respuesta inmune de los anticuerpos en los seres humanos y que reconozcan formas oncogénicas o activadas de EGFR, así como formas amplificadas o sobreexpresadas de EGFR.

[0018] La citación de referencias en el presente documento no debe interpretarse como una admisión de que tal es la técnica anterior para la presente invención.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0019] De acuerdo con la presente invención, y para dilucidar el mecanismo que conduce a la especificidad única y el modo de la actividad antitumoral del anticuerpo de EGFR mAb806, se ha determinado el epítipo de unión a EGFR de mAb 806. El péptido del receptor epitópico, CGADSYEMEEEDGVRKC (SEQ ID NO: 1) contiene el epítipo mAb806. El péptido de receptor es adecuado para generar anticuerpos de EGFR que sean capaces de reconocer el EGFR que se encuentra en las células tumorigénicas, hiperproliferativas o anormales y no es detectable o transitorio en células normales o de tipo salvaje (la expresión "célula de tipo salvaje" como se usa en el presente documento, contempla una célula que expresa EGFR endógeno pero no el de 2-7 EGFR, y la expresión excluye específicamente una célula que sobreexpresa el gen de EGFR; la expresión "de tipo salvaje" se refiere a un genotipo o fenotipo u otras características presentes en una célula normal en lugar de en una célula anormal o tumorigénica).

[0020] La presente invención y realizaciones de la misma se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

[0021] Por lo tanto, la invención proporciona epítopos de receptor, particularmente epítopos de receptor del factor de crecimiento, que pueden utilizarse en la generación de anticuerpos que tienen capacidad y actividad anti-tumoral o que estimulan una respuesta inmunológica que es una respuesta anti-tumoral. Los epítopos de receptor del factor de crecimiento incluyen epítopos de bucle que se exponen en formas transitorias del receptor del factor de crecimiento y son capaces de generar anticuerpos que reconocen formas transitorias del receptor, modulando así, incluyendo evitando o inhibiendo, su activación, incluyendo el cambio de una conformación unida a ligando inactiva a activa. La invención proporciona epítopos de receptor, particularmente epítopos de receptor de la familia de EGF, mucho más particularmente epítopos de EGFR, que pueden utilizarse en la generación de anticuerpos que tienen capacidad y actividad anti-tumoral o que estimulan una respuesta inmunológica que es una respuesta anti-tumoral. En un aspecto general, la invención proporciona un epítipo de receptor, particularmente un epítipo del receptor de EGF o un epítipo de la familia del receptor de EGF, que se encuentra en las células tumorigénicas, hiperproliferativas o anormales y no es detectable o transitorio en células normales o de tipo salvaje.

[0022] De acuerdo con la presente invención, se proporcionan péptidos de receptor del factor de crecimiento, particularmente péptidos de EGFR que son capaces de generar anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales, que tienen actividad anti-tumoral.

[0023] De acuerdo con la presente invención, se proporcionan péptidos de receptor del factor de crecimiento, particularmente péptidos de EGFR que son capaces de generar anticuerpos que son capaces de reconocer el EGFR que se encuentra en las células tumorigénicas, hiperproliferativas o anormales y no es detectable o transitorio en células normales o de tipo salvaje.

[0024] Los péptidos de receptor del factor de crecimiento, particularmente los péptidos de receptor de la familia de EGF, de la presente invención proporcionan usos diagnósticos y terapéuticos para identificar, caracterizar y marcar

varios tipos de tumores, por ejemplo, tumores de cabeza y cuello, mama, pulmón, vejiga, colon o próstata y glioma, sin los problemas asociados con captación del tejido normal que pueden observarse con el receptor del factor de crecimiento conocido previamente, incluyendo EGFR, anticuerpos.

5 **[0025]** La presente invención incluye polipéptidos aislados que consisten en una secuencia aminoacídica seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-10. Los péptidos aislados, incluyendo combinaciones de uno o más de los mismos, son adecuados para su uso en la generación de anticuerpos que reconocen el receptor del factor de crecimiento y tienen actividad anti-tumoral y en la inmunización de animales, particularmente mamíferos, mucho más particularmente seres humanos, que tienen cáncer o una enfermedad tumoral.

10 **[0026]** La presente invención se dirige a un polipéptido de receptor aislado que consiste en la secuencia aminoacídica expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-10.

15 **[0027]** La invención proporciona un péptido aislado que consiste en la secuencia aminoacídica CGADSYEMEEDGVRKC (SEQ ID NO: 1).

[0028] La invención proporciona un péptido aislado que consiste en la secuencia aminoacídica CGADSYEMBEDGVRK (SEQ ID NO: 2).

20 **[0029]** La invención proporciona un péptido aislado que consiste en la secuencia aminoacídica CGPDYYEVEDGIRKC (SEQ ID NO: 3).

[0030] La invención proporciona un péptido aislado que consiste en la secuencia aminoacídica CNTDTYEVEENGVRKC (SEQ ID NO: 4).

25 **[0031]** La invención proporciona un péptido aislado que consiste en la secuencia aminoacídica CGPDSYEVEEDGVRKC (SEQ ID NO: 5).

30 **[0032]** La invención proporciona un péptido aislado que consiste en la secuencia aminoacídica CSSDSYEVEEDGVRKC (SEQ ID NO: 6).

[0033] La invención proporciona un péptido aislado que consiste en la secuencia aminoacídica CGADSYEMEEDAVRKC (SEQ ID NO: 7).

35 **[0034]** La invención proporciona un péptido aislado que consiste en la secuencia aminoacídica CPLHNQEVTAE DGTQRC (SEQ ID NO: 8).

[0035] La invención proporciona un péptido aislado que consiste en la secuencia aminoacídica CPPDKMEVDKNG LKMC (SEQ ID NO: 9).

40 **[0036]** La invención proporciona un péptido aislado que consiste en la secuencia aminoacídica CPSSKMEVEENG I KMC (SEQ ID NO: 10).

[0037] La divulgación proporciona un péptido aislado que consiste en una secuencia aminoacídica:

45 C X₁ X₂ X₃ X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ X₁₂ X₁₃ X₁₄ X₁₅

en la que cada resto X_n puede seleccionarse independientemente como se indica a continuación (SEQ ID NO: 11):

50 X₁ es G, P, N o S;

X₂ es A, P, T, S o L;

X₃ es D, H o S;

55 X₄ es S, Y, T, N o K;

X₅ es Y, Q o M;

X₆ es M o V;

X₇ es E, T o D;

5 X₈ es A o ninguno;

X₉ es E o K;

X₁₀ es D o N;

10

X₁₁ es G o A;

X₁₂ es V, I, L o T;

15 X₁₃ es R, Q o K;

X₁₄ es R, K o M;

X₁₅ es C o ninguno.

20

[0038] La divulgación proporciona un péptido aislado que consiste en una secuencia aminoacídica:

C X₁ X₂ X₃ X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ X₉ X₁₀ X₁₁ X₁₂ X₁₃ X₁₄ X₁₅

25 en la que cada resto X_n puede seleccionarse independientemente como se indica a continuación (SEQ ID NO: 12):

X₁ es G, P, N, Q, S o T

X₂ es A, P, T, S, L, M, V, I o P

30

X₃ es D, E, H, R, K, S o T

X₄ es S, Y, F, W, T, N, Q, K o R

35 X₅ es Y, F, W, Q, N, M, V, A, L, I o P

X₆ es M, V, A, L, I o P

X₇ es E, D, T o S

40

X₈ es A, V, L, I, P, M o ninguno

X₉ es D, E, K o R

45 X₁₀ es D, E, N o Q

X₁₁ es G, A, M, V, L, I o P

X₁₂ es V, I, L, M, A, P, S o T

50

X₁₃ es R, K, H, Q o N

X₁₄ es R, K, H, M, A, V, L, I o P

55 X₁₅ es C o ninguno.

[0039] La divulgación proporciona un péptido aislado que consiste en una secuencia aminoacídica:

C X₁ X₂ X₃ X₄ X₅ E X₆ X₇ X₈ X₉ G X₁₀ X₁₁ X₁₂ C

en la que cada resto X_n puede seleccionarse independientemente como se indica a continuación (SEQ ID NO: 13):

- 5 X_1 es G o A
- X_2 es A o K
- X_3 es D o A
- 10 X_4 es S o A
- X_5 es Y o A
- X_6 es M o A
- 15 X_7 es E o A
- X_8 es E o A
- 20 X_9 es D o A
- X_{10} es V, A o K
- X_{11} es R o A
- 25 X_{12} es K o A.

[0040] La divulgación proporciona un péptido aislado que consiste en la secuencia aminoacídica

- 30 C X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 E X_6 X_7 X_8 DGVRKC

en la que cada resto X_{11} puede seleccionarse independientemente como se indica a continuación (SEQ ID NO: 14):

- 35 X_1 es G o A
- X_2 es A o K
- X_3 es D o A
- 40 X_4 es S o A
- X_5 es Y o A
- X_6 es M o A
- 45 X_7 es E o A
- X_8 es E o A.

- 50 **[0041]** La presente invención proporciona adicionalmente un ácido nucleico aislado que codifica el péptido expuesto en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-10.

- [0042]** La presente invención se extiende a un péptido de receptor inmunogénico, particularmente seleccionado entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-10. La divulgación también se extiende a péptidos de receptores
- 55 inmunogénicos donde dichos polipéptidos comprenden una combinación de al menos un péptido de receptor inmunogénico, seleccionado entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-10.

[0043] La divulgación proporciona un procedimiento para inmunizar un mamífero que comprende administrar un péptido epitópico del receptor del factor de crecimiento o un fragmento inmunogénico del mismo, por lo que se

producen anticuerpos que son inmunorreactivos con el péptido epitópico expuesto en las células que expresan un receptor del factor de crecimiento anormal o sobreexpresado, pero no expuesto en células de tipo salvaje. La divulgación proporciona adicionalmente un procedimiento para inmunizar un mamífero que comprende administrar un péptido del receptor de EGF seleccionado entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-14 o un fragmento
 5 inmunogénico del mismo, por lo que se producen anticuerpos que son inmunorreactivos con el péptido epitópico expuesto en las células que expresan EGFR anormal o sobreexpresado, pero no expuesto en células de tipo salvaje. La divulgación proporciona un procedimiento para inmunizar un mamífero que comprende administrar un péptido del receptor de EGF seleccionado entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-14 o un fragmento inmunogénico del mismo, por lo que se producen anticuerpos que son inmunorreactivos con el péptido epitópico del receptor de
 10 EGF.

[0044] En un aspecto adicional, la divulgación se extiende a vacunas y composiciones inmunogénicas basadas en los péptidos de receptor descritos en el presente documento. La divulgación proporciona una vacuna que comprende uno o más péptidos de EGFR seleccionados entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-14, y un adyuvante
 15 farmacéuticamente aceptable. La divulgación proporciona una vacuna que comprende uno o más péptidos seleccionados entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-14, y un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

[0045] La presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende uno o más péptidos seleccionados entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-10, y un adyuvante farmacéuticamente aceptable.
 20

[0046] La divulgación proporciona adicionalmente una vacuna antitumoral o anti-cáncer que comprende uno o más péptidos del receptor de la familia de EGF seleccionados entre el grupo de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-14, que comprende adicionalmente uno o más antígenos tumorales adicionales. La divulgación proporciona adicionalmente una vacuna tumoral o contra el cáncer que comprende uno o más péptidos del receptor de la familia de EGF
 25 seleccionados entre el grupo de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-14, que comprende adicionalmente uno o más antígenos de EGF o EGFR adicionales.

[0047] En otro caso, la divulgación se refiere a una vacuna para el tratamiento de un mamífero, particularmente un ser humano, un sujeto que padece cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, pulmón, vejiga, colon o tumores de
 30 próstata y glioma, o cualquier otro tumor que muestra una expresión aberrante de EGFR (o cualquiera de la familia de receptores EGFR) que comprende una cantidad inmunogénica de uno o más péptidos del receptor de la familia de EGF seleccionados entre el grupo de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-14 o un fragmento inmunogénico de los mismos. Tal vacuna puede contener el péptido y un adyuvante farmacéuticamente aceptable. Tal vacuna puede contener adicionalmente el péptido conjugado con un portador.
 35

[0048] La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un péptido del receptor de la familia de EGF seleccionado entre uno o más péptidos seleccionados entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-10, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0049] Todavía en un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un anticuerpo purificado para un péptido de receptor de la familia de EGF seleccionado entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-14.
 40

[0050] Los anticuerpos contra los polipéptidos aislados de la presente invención incluyen anticuerpos de origen natural y preparados de forma recombinante. Estos pueden incluir anticuerpos tanto policlonales como monoclonales
 45 preparados mediante técnicas genéticas conocidas, así como anticuerpos biespecíficos, y anticuerpos que incluyen otras funcionalidades que los adecuan para uso diagnóstico o terapéutico. Dichos anticuerpos pueden usarse en inmunoensayos para caracterizar tumores o diagnosticar cáncer, incluyendo, pero sin limitación, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de laringe, carcinoma de células escamosas, o tumores de próstata y glioma. Los anticuerpos también pueden usarse para la inmunización
 50 pasiva con el fin de reducir tumores o tratar un cáncer, incluyendo, pero sin limitación, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de laringe, carcinoma de células escamosas, o tumores de próstata y glioma

[0051] Se desvela adicionalmente un anticuerpo para un péptido de receptor de la familia de EGF seleccionado entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-14 marcado con un marcador detectable. En casos particulares, el marcador puede seleccionarse entre el grupo que consiste en una enzima, un producto químico que se hace fluorescente, y un elemento radioactivo. En el caso en el que se usa un marcador radioactivo, tal como los isótopos ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{52}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{111}I , ^{99}Tc y ^{186}Re , pueden utilizarse procedimientos de recuento conocidos actualmente disponibles. En el caso en el que el marcador es una enzima, la detección se puede realizar

mediante cualquiera de las técnicas colorimétricas, espectrofotométricas, fluoroespectrofotométricas, amperométricas o gasométricas actualmente utilizadas conocidas en la técnica.

- [0052]** La divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más anticuerpos para un péptido de receptor de la familia de EGF seleccionado entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-14, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La divulgación proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende una combinación de al menos dos anticuerpos para un péptido de receptor de la familia de EGF seleccionado entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-14 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- [0053]** En una realización adicional, la divulgación se refiere a ciertos procedimientos terapéuticos que se basarán en la actividad de un anticuerpo, o fragmentos activos del mismo, para un péptido de receptor de la familia de EGF seleccionado entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-14, o en agentes u otros fármacos determinados como poseedores de la misma actividad. Un primer procedimiento terapéutico se asocia con la prevención o el tratamiento de cáncer, incluyendo, pero sin limitación, de cabeza y cuello, pulmón, colon, vejiga, mama, próstata y glioma.
- [0054]** En particular, los anticuerpos de la divulgación, o fragmentos activos de los mismos, y anticuerpos quiméricos o sintéticos obtenidos a partir de los mismos pueden prepararse en composiciones farmacéuticas, incluyendo un vehículo, portador o diluyente adecuado, para su administración en casos en los que la terapia es apropiada, tal como para tratar el cáncer. Dichas composiciones farmacéuticas también pueden incluir procedimientos de modulación de la semivida de los miembros de unión, anticuerpos o fragmentos por procedimientos conocidos en la técnica, tales como pegilación. Dichas composiciones farmacéuticas pueden comprender adicionalmente anticuerpos o agentes terapéuticos adicionales.
- [0055]** Por lo tanto, una composición de la divulgación puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, sustancias terapéuticas o agentes, ya sea simultáneamente o sucesivamente dependiendo de la afección que se vaya a tratar. Además, la divulgación contempla e incluye composiciones que comprenden anticuerpos para un péptido del receptor de la familia de EGF seleccionado entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-14, particularmente un anticuerpo o fragmento del mismo, descrito en el presente documento y otros agentes o sustancias terapéuticas, tales como agentes anti-cancerosos o terapéuticos, agentes o anticuerpos anti-EGFR, o moduladores inmunitarios. Más generalmente estos agentes anticancerosos pueden ser inhibidores de tirosina cinasa, tales como AG1478, ZD1839 (gefitinib) o ST1571 (imatinib mesilato), inhibidores de la cascada de fosforilación, moduladores post-traduccionales, inhibidores del crecimiento o la división celular (por ejemplo, anti-mitóticos), inhibidores de PDGFR o inhibidores de transducción de señal. Otros tratamientos o agentes terapéuticos pueden incluir la administración de dosis adecuadas de fármacos que alivian el dolor tales como los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (por ejemplo aspirina, paracetamol, ibuprofeno o cetoprofeno) u opiáceos tales como morfina, o anti-eméticos. De este modo, estos agentes pueden ser agentes específicos anti-EGFR, tales como AG1478 o ZD1839, o pueden ser agentes anti-cancerosos y anti-neoplásicos más generales, incluyendo los ejemplos no limitantes doxorubicina, carboplatino y cisplatino. Además, la composición puede administrarse con moduladores inmunitarios, tales como interleucinas, factor de necrosis tumoral (TNF) u otros factores de crecimiento, citocinas u hormonas tales como dexametasona que estimula la respuesta inmune y la reducción o eliminación de las células cancerosas o tumores. La composición también puede administrarse con, o puede incluir combinaciones junto con otros anticuerpos anti-EGFR, incluyendo, pero sin limitación, los anticuerpos anti-EGFR 528; 225; SC-03; 108 (ATCC HB9764) Patente de Estados Unidos Nº 6.217.866; 14E1 (Patente de Estados Unidos Nº 5.942.602); DH8.3; L8A4; Y10; HuMAX-EGFr (Genmab/Medarex); ICR62; y ABX-EGF (Abgenix).
- [0056]** La divulgación también incluye anticuerpos para un péptido de receptor de la familia de EGF seleccionado entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-14, y cualquier fragmento de los mismos, que se unen covalentemente a, o de otro modo se asocian con otras moléculas o agentes que se van a usar con fines terapéuticos o diagnósticos. Estas otras moléculas o agentes incluyen, pero sin limitación, moléculas (incluyendo otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos) con distintas características, toxinas, ligandos, isótopos radioactivos y agentes quimioterapéuticos. Existen muchas moléculas o agentes bien conocidas que se han unido covalentemente o se asocian de otro modo a anticuerpos que se van a usar con fines terapéuticos. Los ejemplos de dichas moléculas o agentes incluyen, pero sin limitación: toxinas, tales como caliqueamicina, maitansinoide, duocarmicina, ricina, toxina diftérica y exotoxina de pseudomonas; ligandos, tales como factor de necrosis tumoral (TNF); isótopos radioactivos, tales como ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{211}At , ^{225}Ac , ^{213}Bi y otro isótopo α , β o γ emisor; y fármacos quimioterapéuticos como paclitaxel (Taxol®) y doxorubicina (Adriamycin®).
- [0057]** La divulgación contempla el uso de los péptidos de receptor y anticuerpos para los mismos en pruebas diagnósticas y procedimientos para determinar y/o controlar tumores y cáncer, incluyendo cáncer de cabeza y cuello,

cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de laringe, carcinoma de células escamosas, o tumores de próstata y glioma.

[0058] La divulgación también se refiere a ácidos nucleicos aislados, tales como moléculas de ADN recombinante o genes clonales, o a ácidos nucleicos aislados, tales como moléculas de ADN recombinante o genes clonados, o variantes degeneradas de los mismos, mutantes, análogos o fragmentos de los mismos, que codifican el péptido de receptor del factor de crecimiento aislado de la presente invención o que inhiben de forma competitiva la actividad del polipéptido. La presente invención se refiere adicionalmente a ácidos nucleicos aislados, tales como moléculas de ADN recombinante o genes clonados, o variantes degeneradas de los mismos, mutantes, análogos o fragmentos de los mismos, que codifican un péptido de receptor de la familia de EGF seleccionado entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-10. En una realización adicional de la invención, la secuencia de ADN de la molécula de ADN recombinante o el gen clonado puede unirse de forma operativa a una secuencia de control de la expresión que puede introducirse en un huésped apropiado. Por consiguiente, la invención se extiende a huéspedes unicelulares transformados con la molécula de ADN recombinante que comprende una secuencia de ADN que codifica un péptido de receptor de la familia de EGF seleccionado entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-10.

[0059] Se proporciona adicionalmente un ácido nucleico capaz de codificar un péptido de receptor de la familia de EGF seleccionado entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-10, que es una molécula de ADN recombinante. También se proporciona en el presente documento tal molécula de ADN recombinante donde la molécula de ADN está unida operativamente a una secuencia de control de la expresión.

[0060] La divulgación se refiere a vacunas de ácidos nucleicos o vacunas de ADN que comprenden ácidos nucleicos que codifican péptidos del receptor de la familia de EGF inmunogénicos, particularmente seleccionados entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-14. La divulgación se refiere a vacunas de ácidos nucleicos o vacunas de ADN que comprenden ácidos nucleicos que codifican uno o más péptidos del receptor de la familia de EGF inmunogénicos seleccionados entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-14 con al menos un polipéptido distinto, particularmente un antígeno tumoral o un péptido de molécula inmunomoduladora.

[0061] La presente invención proporciona un vector que comprende el ácido nucleico capaz de codificar un péptido de receptor de la familia de EGF seleccionado entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-10 y un promotor. La invención contempla un vector donde el promotor comprende un promotor bacteriano, de levadura, de inserto o de mamífero. La invención contempla un vector donde el vector es un plásmido, cósmido, cromosoma de levadura artificial (YAC), bacteriófago o ADN vírico eucariota.

[0062] La presente invención proporciona adicionalmente un sistema vector huésped para la producción de un polipéptido que comprende el vector capaz de codificar un péptido de receptor de la familia de EGF seleccionado entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-10 en una célula huésped adecuada. Se proporciona un sistema vector huésped en el que la célula huésped adecuada comprende una célula procariota o eucariota. Así, se proporciona un huésped unicelular transformado con una molécula de ADN recombinante o un vector capaz de codificar un péptido de receptor de la familia de EGF seleccionado entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-10.

[0063] La divulgación incluye procedimientos para determinar y controlar tumores y un cáncer, incluyendo cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, o tumores de próstata y glioma mediante la detección de la presencia o exposición de un péptido epitópico del receptor de EGF seleccionado entre el grupo de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-14. En tal procedimiento particular, el péptido epitópico del receptor de EGF se mide:

a. poniendo en contacto una muestra en la que se sospecha la presencia o exposición de un péptido epitópico del receptor de EGF seleccionado entre el grupo de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-14 con un anticuerpo para dicho péptido del receptor de EGF en condiciones que permiten que se produzca la unión del péptido al anticuerpo; y

b. detectando si la unión ha ocurrido entre el péptido epitópico del receptor de EGF de la muestra y el anticuerpo;

donde la detección de la unión indica la presencia o exposición del péptido epitópico del receptor de EGF en la muestra.

[0064] La divulgación incluye un sistema de ensayo para el cribado de compuestos potenciales eficaces para modular la exposición de un péptido epitópico del receptor de EGF de la presente invención o la estabilidad de un estado transitorio de EGFR. En un caso, el compuesto de ensayo, o un extracto que contiene el compuesto, puede administrarse a una muestra celular que expresa el EGFR particular para determinar el efecto del compuesto tras la

exposición de un péptido epitópico del receptor de EGF de la presente invención o la estabilidad de un estado transitorio de EGFR mediante comparación con un control.

[0065] Se desvela un procedimiento para el tratamiento de mamíferos que padecen tumores o cáncer, incluyendo 5 cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de laringe, carcinoma de células escamosas, o tumores de próstata y gliomas.

[0066] La divulgación proporciona un procedimiento para el tratamiento de mamíferos que padecen tumores o 10 cáncer, incluyendo cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de laringe, carcinoma de células escamosas, o tumores de próstata y glioma que comprende administrar una dosis inmunogénicamente eficaz de una vacuna que comprende un péptido epitópico del receptor de EGF seleccionado entre el grupo de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-14 a un sujeto.

[0067] La divulgación proporciona un procedimiento para inducir una respuesta inmune en un sujeto que tiene 15 tumores o cáncer, incluyendo cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de laringe, carcinoma de células escamosas, o tumores de próstata y glioma, que comprende administrar al sujeto una cantidad de la composición farmacéutica que comprende un péptido epitópico del receptor de EGF seleccionado entre el grupo de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-14, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, induciendo de este modo una respuesta inmune.

[0068] Otros objetos y ventajas se harán evidentes para los expertos en la técnica a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada, que continúa con la referencia a los siguientes dibujos ilustrativos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0069]

Figura 1. Reactividad de mAb 806 con fragmentos del EGFR. Los fragmentos solubles del EGFR (1-513 y 310-501) o los lisados celulares que contenían proteínas de fusión de la hormona de crecimiento/fragmento de EGFR (GH- 274-501, GH-282-501, GH-290-501 y GH-298-501) se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a membrana y se 30 sometieron a inmunotinción con mAb 806 (panel izquierdo) o el anticuerpo anti-myc 9B11 (panel derecho).

Figura 2A-2B. Reactividad de mAb 806 con fragmentos del EGFR presentes sobre levadura. **A**, Histogramas de 35 citometría de flujo representativos que representan la señal de fluorescencia media del marcado de mAb 806 de fragmentos de EGFR presentes en levaduras. Con la presentación en levadura, un porcentaje de las células no expresa proteínas sobre su superficie dando como resultado 2 picos en el histograma. mAb 806 no se unió al control negativo no inducido **B**, El fragmento de 1-501 se desnaturalizó calentando gránulos de levadura a 80 °C durante 30 min. El marcador C-terminal c-myc lineal sobre el fragmento 1-501 aún se reconoció por el anticuerpo 9E10, lo que demuestra que el tratamiento térmico no comprende el fragmento presente sobre la superficie de la levadura. El mAb 40 225 sensible de conformación se usó para confirmar la desnaturalización.

Figura 3A-3B. Inhibición de la unión de mAb 806 con un péptido derivado de EGFR. **A**, Los fragmentos de 1-501 y GH-274-501 se sometieron a inmunotransferencia con mAb 806 (paneles superiores) como se describe en la Figura 1 en presencia o ausencia del péptido de EGFR 287-302. La presencia de fragmentos de EGFR se confirmó 45 después de la inmunotransferencia de mAb 806 mediante la separación de membranas y el re-sondeo con anti-myc (paneles inferiores). **B**, Las placas ELISA se recubrieron con el fragmento de EGFR 1-501 y después se incubaron con mAb 806 en presencia de concentraciones en aumento de los péptidos de EGFR 287-302 o 287-298. Los datos se expresan como A_{405} media $\pm$ DE.

Figura 4A-4B. Inhibición de la unión de mAb 806 con péptido de EGFR 287-302 químicamente modificado. **A**, Las 50 placas se recubrieron con 501-Fc y después se incubaron con mAb 806 en presencia de concentraciones en aumento de péptido de EGFR 287-302 oxidado, reducido y madurado (preparado como se describe en la sección Procedimientos Experimentales). Los datos se expresan como porcentaje de inhibición medio $\pm$ DE (las barras de error son demasiado pequeñas para ser visibles). **B**, Las placas ELISA se recubrieron con 501-Fc y después se 55 incubaron con mAb 806 en presencia de concentraciones en aumento del péptido de EGFR 287-302 S-carboximetilado o los péptidos N-terminal (CGADSYEM) (SEQ ID NO:) y C-terminal (EEGVRKC) (SEQ ID NO:) creados a partir de la escisión CNBr del péptido de EGFR 287-302. Los datos se expresan como porcentaje de inhibición medio $\pm$ DE (las barras de error son demasiado pequeñas para ser visibles).

Figura 5A-5B. Análisis de unión de mAb 806 a péptidos por BIAcore. **A**, El péptido de EGFR 287-302 se inmovilizó sobre la superficie mediante acoplamiento tiol y el anticuerpo mAb 806 se pasó en concentraciones en aumento (31,25, 62,5, 125, 250, 500 y 1000 nM). Después, la afinidad de unión se determinó por análisis Scatchard (inserto). **B**, El péptido de EGFR 287-302 se inmovilizó sobre la superficie mediante acoplamiento amina y el anticuerpo mAb 806 a una concentración de 500 nM se pasó sobre la superficie en presencia de los péptidos de EGFR 287-302 (panel superior), 287-298 (panel central) o 287-301 (panel inferior) (5 y 10 μ M).

Figura 6A-6D. Localización del epítipo mAb 806 en la estructura de EGFR. **A**, Traza de carbono que muestra la estructura del bucle de cisteína que contiene el epítipo mAb 806. **B**, Modelo de espacio lleno de la forma dimérica unida a ligando del EGFR. El dímero se estabiliza predominantemente por los dos brazos de dimerización situados en el bucle de CR1 de cada módulo de EGFR. **C**, Forma amarrada del EGFR que muestra la interacción auto-inhibitoria entre los dominios CR1 y CR2, que impide la dimerización. **D**, Forma extendida (transitoria) del EGFR que muestra claramente el brazo de dimerización (figura izquierda) del bucle de CR1 preparado y listo para la interacción con un segundo bucle en una molécula adyacente. Colores: El ligando de EGF se muestra en color naranja; el sitio de glucosilación en el aminoácido 579 de color rojo y el epítipo mAb 806 de color púrpura. Se han descrito previamente en detalle las estructuras de EGFR (31, 35, 36) y un posible mecanismo de activación del receptor.

Figura 7. Análisis de citometría de flujo de células 293T que expresan delecciones del bucle de CR1 del EGFR. Las células parentales 293, que expresan bajas cantidades de EGFR de tipo salvaje endógeno, se transfectaron con el EGFR de2-7 o el EGFR de bucle de deCR1 (2 clones independientes) y se tiñeron con un anticuerpo IgG2b irrelevante (histogramas abiertos), mAb 528 (histogramas de color negro) o mAb 806 (histogramas de color gris).

Figura 8A-8C. **A**, Posible mecanismo anti-tumoral de mAb 806. El mAb 806 no puede unirse al EGFR inactivo pero según el receptor se libera, el epítipo mAb 806 queda expuesto permitiendo que el anticuerpo se una. La unión de mAb 806 al receptor seguramente impedirá la dimerización, y por lo tanto la señalización de EGFR, y puede inducir la internalización de EGFR. **B**, Homología del mAb 806 que contiene un bucle de cisteína en ErbB3 y ErbB4. Se muestran aminoácidos conservados en ErbB1 en color rojo y los anticuerpos restos que presentan conservación de la carga se muestran en color verde. **C**, La interfaz dimérica CR1-CR2. El primer resto carbohidrato unido a N579 es claramente visible en la estructura cristalina y se localiza en la interfaz dimérica CR1-CR2. En las células que sobreexpresan el EGFR, este sitio únicamente se glicosila el 80% de las veces. Las diferencias en la glucosilación pueden afectar a la dinámica del amarre y por tanto a la reactividad de mAb 806.

Figura 9A-9B. **A**) Representación esquemática de la estructura del dominio de hEGFR y de las mutaciones construidas para este estudio. Abreviaturas: **L**, Dominios de unión de ligando; **CR**, dominios ricos en cisteína; **JM**, dominio de yuxtamembrana; **C-T**, dominio carboxi-terminal. **B**) **Panel superior:** Diagramas de cintas de la forma dimérica libre del EGFR ECD (1-501) en complejo con TGF α (de Garrett y col., 2002). Las moléculas de EGFR son de color azul y verde; las moléculas de TGF α unidas son de color púrpura. El epítipo para mAb806 (descrito más adelante) es de color rosa. **Panel inferior:** Diagrama de cintas de la forma libre del EGFR ECD (1-621) (de Ferguson y col., 2003). El dominio CR2 (aa 501-621) se muestra en amarillo. En ambos paneles, los insertos destacan las interacciones entre los bucles de CR1 de la conformación libre o entre el bucle de CR1 y el dominio CR2 en la conformación libre. Los aminoácidos mutados en los patrones se muestran en los insertos. Los átomos en estrecho contacto de van der Waals se conectan por líneas de puntos, y los enlaces a hidrógeno se representan por líneas discontinuas.

Figura 10. Análisis FACS de líneas celulares BaF/3 que expresan de forma estable EGFR wt o mutante. Las células se incubaron con mAb528 seguido de Ig anti-ratón marcada con Alexa 488 como se detallada en la sección Procedimientos Experimentales. Las representaciones representan la intensidad de fluorescencia sobre la abscisa y el número de células por canal de fluorescencia en la ordenada. La fluorescencia de control negativo (anticuerpo irrelevante) se traza en cada panel de forma superpuesta de color gris claro.

Figura 11. Análisis Scatchard de unión de EGF a receptores wt y mutantes. Las afinidades de unión a ligando se determinaron a una concentración fija de 125 I-EGF mediante competición con EGF no marcado (véase la sección Procedimientos Experimentales). Las representaciones se generaron a partir de los datos en bruto usando la versión "Kell for Windows" del programa RadLig (BioSoft).

Figura 12A-12C. Dimerización de EGFR WT y mutantes, y contenido de fosfotirosina específica de complejos del receptor. Las células quiescentes se trataron con EGF (100 ng/ml, 16 nM) o tampón de control. El enlazador cruzado impermeable a células homobifuncional BS³ se añadió inmediatamente, y la incubación continuó durante 30 min a temperatura ambiente. Después de interrumpir la reacción, las células se lisaron, las proteínas celulares se

separaron por SDS/PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF para inmunotransferencia. **A)** Inmunodetección de proteína de EGFR (superior) y fosfotirosina (inferior). La membrana de PVDF se separó después de la exposición anticuerpo anti-fosfotirosina y se sondeó de nuevo con el anticuerpo anti-EGFR. **B)** Relaciones del dímero con respecto a EGFR total (dímero + monómero) con y sin estimulación de EGFR, determinadas por densitometría de exploración cuantitativa como se describe en la sección Procedimientos Experimentales. **C)** Relaciones del contenido de fosfotirosina con respecto a proteína monomérica y dimerica de EGFR, determinadas por densitometría de exploración cuantitativa como anteriormente.

Figura 13A-13C. Fosforilación de tirosina dependiente de ligando y activación de MAPK. **A)** Las células quiescentes se expusieron a EGF (100 nM) durante 10 min a temperatura ambiente, después se lisaron directamente en tampón de muestra SDS-PAGE. Las proteínas se separaron en geles al 4-12%, se transfirieron a membranas de PVDF y se sondearon con anticuerpos para fosfotirosina (superior) o para phospho-MAPK (inferior). Las transferencias se separaron y se sondearon de nuevo con anticuerpos anti-EGFR o anticuerpos anti-MAPK respectivamente (no mostrado) para permitir la determinación de fosforilación proteica específica como se describe en la sección Procedimientos Experimentales. **B)** Relaciones de fosfotirosina con respecto a proteína de EGFR para receptores wt y mutante. **C)** Relación de phospho-MAPK con respecto a la proteína MAPK total.

Figura 14A-14C. Dosis-respuesta de la activación de EGFR en mutantes CR2. Las células que expresan los receptores en mutantes wt o CR2 se volvieron quiescentes por el factor de crecimiento y la retirada del suero, después se expusieron a tampón de control o a concentraciones en aumento de EGF (0,03 a 100 nM). **A):** Los lisados celulares totales se analizaron por SDS/PAGE en geles de gradiente del 4-12% seguido de inmunotransferencia con anticuerpos anti-fosfotirosina, anti-EGFR o anti-phospho-MAPK. **B)** y **C):** las películas se exploraron para determinar la cuantificación densitométrica de las bandas reactivas y los datos de phospho-Shc y phospho-MAPK se trazaron como % de intensidad de banda máxima frente a la concentración de EGF. Los símbolos son: círculos negros, wtEGFR; triángulos negros, D⁵⁶³H-EGFR; triángulos blancos, V⁵⁸³D-EGFR; cuadrados blancos, E⁵⁷⁸C-EGFR.

Figura 15. Respuesta mitogénica a EGF de células BaF/3 que expresan EGFR wt o mutante. La incorporación de [³H]Timidina en células tratadas con tampón de control (círculos blancos) o concentraciones en aumento de EGF (círculos rellenos) se determinó como se describe en la sección Procedimientos Experimentales.

Figura 16. Comparación de unión de anticuerpos mAb528 y mAb806 a células BaF/3 que expresan EGFR carente del bucle de CR1. Las células que expresaban los EGFR wt, Δ2-7 o bucle de Δ-CR1 se tiñeron con mAb528 (línea oscura) o mAb806 (relleno gris) como se describe en la Figura, y se analizaron en un FACScan. El canal de fluorescencia media para cada pico se determinó usando el software de análisis estadístico CellQuest y se usó para calcular las relaciones entre los dos anticuerpos. La fluorescencia de control de un anticuerpo irrelevante de clase equivalente se presenta como una superposición con línea de puntos.

Figura 17A-17C. Conformaciones de EGFR y activación. El EGFR experimenta un cambio conformacional importante durante la transición del estado de baja afinidad al estado de alta afinidad. La conformación de baja afinidad **(A)** se amarra por interacciones intra-moleculares entre los dos dominios ricos en cisteína CR1 y CR2. El monómero amarrado **(A)** está en equilibrio con el dímero amarrado **(B)** o un monómero libre de alta afinidad **(F)**. Parece que los dominios transmembrana (TM) y/o cinasa impulsan la formación de tanto el dímero amarrado **(B)** como el dímero libre **(C)**. El dímero amarrado **(B)** se representa en el dibujo con contactos inter-molecular entre ambos tanto el dominio ECD como cinasa. Las formas amarradas del receptor son de baja afinidad. El monómero y el dímero libres tienen mayor afinidad. Los dominios de cinasa intracelular del dímero libre no se activan hasta que la unión del ligando (por ejemplo EGF o TGF-α) induce una reorientación adicional en el complejo dímero-ligando **(D)**. El complejo receptor-ligando es capaz de formar oligómeros de mayor orden (por ejemplo, tetrámeros, **E**). La afinidad de unión de ligando se modula adicionalmente mediante señalización de dentro hacia fuera (por ejemplo, ATP). Aunque la unión a ligando y la dimerización/oligomerización conducen a la activación de la cinasa y la fosforilación del sustrato, la señalización del receptor también se regula por internalización, degradación y desfosforilación.

Figura 18A-18D representa datos de citometría de flujo para la unión de mAb 806 al fragmento de EGFR presente sobre la superficie de la levadura 273-621. La fluorescencia presente sobre EGFR como se detecta por la etiqueta c-myc se muestra sobre la abscisa, y la unión de mAb 806 se muestra en la ordenada. **(A)** Clase 1 (mAb 80610 nM) y clase 2 (75 nM), con puertas de clasificación indicadas por líneas continuas. **(B-D)** Mutantes representativos de la unión de **(B)**, + **(C)** y ++ **(D)**, y controles positivos y negativos a 75 nM. WT = EGFR de tipo salvaje 273-621.

Figura 19 representa la titulación de mAb 806 contra EGFR 273-621 presente sobre la superficie de la levadura y mutantes. Negro, de tipo salvaje (++); gris oscuro, C287R (+); gris claro, E293K (-). Se realizó un ajuste global a un modelo de unión a sitio único con tres conjuntos independientes de datos (Los cuadrados, triángulos y rombos representan conjuntos separados).

Figura 20A-20D. Epítipo mAb 806. **(A-B)** Vistas frontal y posterior del epítipo en la cadena a de la estructura dimérica EGFR-EGF (PDB ID 1IVO). La estructura dimérica se usa porque Glu293 no se resuelve en la estructura monomérica (PDB ID 1NQL). Los restos mostrados en colores son mutantes aislados de la biblioteca por la pérdida de unión. Rojo, restos que también provocan la pérdida de unión tras la sustitución de alanina; naranja, restos que no; gris, restos que no se aislaron de la biblioteca y no mostraron pérdida de unión tras la sustitución de alanina. **(C)** El epítipo se restringe por un enlace disulfuro y dos puentes de sal (Glu293-Arg300 y Asp297-Lys301). Residuos cargados negativamente, rojo; positivo, azul; cisteínas, amarillo. La imagen incluye los restos 287-302 en ambas moléculas de EGFR en la estructura dimérica (PDB ID 1IVO). **(D)** Epítipo mAb 806 en monómero de EGFR autoinhibido, mismo color que en **(A)**, con el resto del EGFR azul.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0070] De acuerdo con la presente invención pueden emplearse técnicas de biología molecular, microbiología y ADN recombinante convencionales dentro del alcance de los expertos en la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo Sambrook y col., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III [Ausubel, R. M., ed. (1994)]; "Cell Biology: A Laboratory Handbook" Volúmenes I-III [J. E. Celis, ed. (1994)]; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III [Coligan, J. E., ed. (1994)]; "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait ed. 1984); "Nucleic Acid Hybridization" [B.D. Hames & S.J. Higgins eds. (1985)]; "Transcription And Translation" [B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984)]; "Animal Cell Culture" [R.I. Freshney, ed. (1986)]; "Immobilized Cells And Enzymes" [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984).

[0071] Por lo tanto, si aparecen en el presente documento, los siguientes términos tendrán las definiciones expuestas a continuación.

[0072] Las expresiones "péptidos de receptor del factor de crecimiento", "péptidos de epítipos de receptor", "péptidos de receptor de la familia de EGF", "péptidos del receptor de EGF", "epítipos de EGFR", "péptidos de EGFR" y cualquier variante no enumerado específicamente, puede usarse en el presente documento de forma intercambiable, y como se usa a lo largo de toda la presente solicitud y las reivindicaciones, se refieren a material peptídico que incluye péptidos individuales o múltiples, y se extiende a aquellos péptidos que tienen los datos de la secuencia aminoacídica descritos en el presente documento y se presentan en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-14 y en las TABLAS 1 y 2, y variantes de los mismos, y el perfil de actividades expuesto en el presente documento y en las reivindicaciones. Por consiguiente, se contemplan del mismo modo las proteínas que presentan una actividad esencialmente equivalente o alterada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, por ejemplo, tales como las modificaciones obtenidas a través de la mutagénesis dirigida a sitio, o pueden ser accidental, tales como las obtenidas a través de mutaciones en huéspedes que son productores del complejo o sus denominadas subunidades. Se conocen bien por los expertos en la técnica procedimientos para generar y ensayar modificaciones de los péptidos de epítipos de receptor, incluyendo variantes de los mismos, incluyendo, pero sin limitación, mediante mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis al azar, e incluyen los descritos e ilustrados en el presente documento y como se proporciona en el Ejemplo 3 del mismo. Además, las expresiones "péptidos del receptor del factor de crecimiento", "péptidos de epítipos de receptor", "péptidos de receptor de la familia de EGF", "péptidos del receptor de EGF", "epítipos de EGFR", "péptidos de EGFR" pretenden incluir dentro de su alcance proteínas citadas específicamente en el presente documento, así como todos los análogos y variaciones alélicas sustancialmente homólogas.

[0073] Se prefiere que los restos aminoacídicos descritos en el presente documento estén en forma isomérica "L". Sin embargo, los restos en forma isomérica "D" se pueden sustituir por cualquier resto aminoacídico L, siempre que el polipéptido conserve la propiedad funcional de unión a inmunoglobulina deseada. NH₂ hace referencia al grupo amino libre presente en el extremo amino de un polipéptido. COOH hace referencia al grupo carboxi libre presente en el extremo carboxi de un polipéptido. De acuerdo con la nomenclatura de polipéptidos convencional, J Biol. Chem., 243: 3552-59 (1969), las abreviaturas para los restos aminoacídicos se muestran en la siguiente Tabla de Correspondencias:

TABLA DE CORRESPONDENCIAS

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

- [0074]** Se debe observar que todas las secuencias de restos aminoacídicos se representan en el presente documento mediante fórmulas cuya orientación izquierda y derecha está en la orientación convencional de extremo amino a extremo carboxi. Además, se debe observar que un guión al principio o al final de una secuencia de restos aminoacídicos indica un enlace peptídico a una secuencia adicional de uno o más restos aminoacídicos. La Tabla anterior se presenta para relacionar las notaciones de tres letras y una letra que pueden aparecer de manera alternativa en el presente documento.
- 10 **[0075]** Un "replicón" es cualquier elemento genético (por ejemplo, plásmido, cromosoma, virus) que funciona como unidad autónoma de replicación de ADN *in vivo*; es decir, susceptible de replicación bajo su propio control.
- [0076]** Un "vector" es un replicón, tal como un plásmido, fago o cósmido, al que se puede unir otro segmento de ADN con el fin de ocasionar la replicación del segmento unido.
- 15 **[0077]** Una "molécula de ADN" se refiere a la forma polimérica de los desoxirribonucleótidos (adenina, guanina, timina, o citosina) en su forma monocatenaria, o en una hélice de doble cadena. Este término se refiere solamente a la estructura primaria y secundaria de la molécula, y no se limita a ninguna de sus formas terciarias concretas. De este modo, este término incluye ADN de doble cadena encontrado, entre otros, en moléculas de ADN lineal (por ejemplo, fragmentos de restricción), virus, plásmidos, y cromosomas. En el estudio de la estructura de moléculas de ADN de doble cadena concretas, las secuencias pueden describirse en el presente documento de acuerdo con la convención normal de dar solamente la secuencia en dirección 5' a 3' a lo largo de la hebra no transcrita de ADN (es decir, la hebra que tiene una secuencia homóloga al ARNm).
- 20 **[0078]** Un "origen de replicación" se refiere a aquellas secuencias de ADN que participan en la síntesis de ADN
- [0079]** Una "secuencia codificante" de ADN es una secuencia de ADN de doble cadena que se transcribe y se traduce en un polipéptido *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan por un codón de inicio en el extremo 5' (amino) y un codón de parada de traducción en el extremo 3' (carboxilo). Una secuencia codificante puede incluir, pero sin limitación, secuencias procarióticas, ADNc de ARNm eucariótico, secuencias de ADN genómico de ADN eucariótico (por ejemplo, de mamífero), e incluso secuencias de ADN sintéticas. Una señal de poliadenilación y una secuencia de terminación de la transcripción se localizarán normalmente en 3' con respecto a la secuencia codificante.
- 30 **[0080]** Las secuencias de control transcripcional y traduccional son secuencias reguladoras de ADN, tales como promotores, potenciadores, señales de poliadenilación, terminadores, y similares, que proporcionan la expresión de una secuencia codificante en una célula huésped.

[0081] Una "secuencia promotora" es una región reguladora de ADN susceptible de unirse a la ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificante aguas abajo (dirección 3'). Con el fin de definir la presente invención, la secuencia promotora se une en su extremo 3' por el sitio de inicio de la transcripción y se
 5 extiende aguas arriba (dirección 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectables por encima del fondo. En la secuencia promotora se encontrará un sitio de inicio de la transcripción (definido convenientemente por el mapeo con nucleasa S1), así como también los dominios de unión a proteínas (secuencias consenso) responsables de la unión de la ARN polimerasa. Los promotores eucarióticos comprenderán, a menudo, cajas "TATA" y cajas "CAT". Los promotores procarióticos contienen
 10 secuencias de Shine-Dalgarno además de las secuencias consenso -10 y -35.

[0082] Una "secuencia de control de la expresión" es una secuencia de ADN que controla y regula la transcripción y la traducción de otra secuencia de ADN. Una secuencia codificante está "bajo el control" de las secuencias de control transcripcional y traduccional en una célula cuando la ARN polimerasa transcribe la secuencia codificante a
 15 ARNm, que después se traduce a la proteína codificada por la secuencia codificante.

[0083] Se puede incluir una "secuencia señal" antes de la secuencia codificante. Esta secuencia codifica un péptido señal, N-terminal con respecto al polipéptido, que se comunica con la célula huésped para dirigir el polipéptido a la superficie celular o secretar el polipéptido al medio, y este péptido señal se desengancha por la
 20 célula anfitriona antes de que la proteína deje la célula. Se pueden encontrar secuencias señal asociadas con una diversidad de proteínas nativas de procariotas y eucariotas.

[0084] El término "oligonucleótido", como se usa en el presente documento en referencia a la sonda de la presente invención, se define como una molécula comprendida por dos o más ribonucleótidos, preferiblemente más de tres.
 25 Su tamaño exacto dependerá de muchos factores que, a su vez, dependerán de la función y uso últimos del oligonucleótido.

[0085] El término "cebador" como se usa en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido, ya sea de origen natural en forma de un producto purificado de la digestión con enzimas de restricción ya sea producido
 30 sintéticamente, que es capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión con cebadores, que es complementario a una hebra del ácido nucleico, es decir, en presencia de nucleótidos y un agente inductor tal como una ADN polimerasa y a una temperatura y pH adecuados. El cebador puede ser de hebra sencilla o de doble hebra y debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis del producto de extensión deseado en presencia del agente inductor. La longitud exacta
 35 del cebador dependerá de muchos factores, incluyendo la temperatura, la fuente del cebador y el uso del procedimiento. Por ejemplo, para aplicaciones diagnósticas, dependiendo de la complejidad de la secuencia diana, el cebador oligonucleotídico contiene típicamente 15-25 o más nucleótidos, aunque puede contener menos nucleótidos.

[0086] Los cebadores en el presente documento se seleccionan para que sean "sustancialmente" complementarios a diferentes hebras de una secuencia de ADN diana particular. Esto significa que los cebadores deben ser suficientemente complementarios para hibridar con sus respectivas hebras. Por lo tanto, no es necesario que la secuencia del cebador refleje la secuencia exacta del molde. Por ejemplo, se puede unir un fragmento nucleotídico no complementario al extremo 5' del cebador, siendo el resto de la secuencia del cebador
 40 complementaria a la hebra. Como alternativa, se pueden intercalar bases no complementarias o secuencias más largas en el cebador, siempre que la secuencia del cebador sea suficientemente complementaria a la secuencia de la hebra para hibridar con ellas y formar de ese modo el molde para la síntesis del producto de extensión.

[0087] Como se usa en el presente documento, las expresiones "endonucleasas de restricción" y "enzimas de restricción" se refieren a enzimas bacterianas, cada una de las cuales corta el ADN de doble hebra en o cerca de
 50 una secuencia de nucleótidos específica.

[0088] Una célula se ha "transformado" por ADN exógeno o heterólogo cuando tal ADN se ha introducido dentro de la célula. El ADN transformante puede integrarse o no (unido covalentemente) en el ADN cromosómico
 55 constituyendo el genoma de la célula. En procariotas, levadura, y células de mamífero, por ejemplo, el ADN transformante puede mantenerse sobre un elemento episómico, tal como un plásmido. Con respecto a las células eucariotas, una célula transformada establemente es aquella en la se ha integrado ADN transformante en el cromosoma de manera que es heredado por las células hijas a través de la replicación del cromosoma. Esta estabilidad se demuestra por la capacidad de la célula eucariota de establecer líneas celulares o clones

comprendidos por una población de células hijas que contienen el ADN transformante. Un "clon" es una población de células obtenidas a partir de una única célula o ancestro común por mitosis. Una "línea celular" es un clon de una célula primaria que es susceptible de crecimiento estable *in vitro* durante muchas generaciones.

- 5 **[0089]** Dos secuencias de ADN son "sustancialmente homólogas" cuando al menos aproximadamente el 75% (preferiblemente al menos aproximadamente el 80%, y mucho más preferiblemente al menos aproximadamente el 90 o el 95%) de los nucleótidos se emparejan a lo largo de una longitud definida de las secuencias de ADN. Las secuencias que son esencialmente homólogas se pueden identificar comparando las secuencias usando un software convencional disponible en los bancos de datos de secuencias, o en un experimento de hibridación de Southern, por ejemplo, en condiciones restrictivas como se define para ese sistema particular. La definición de las condiciones de hibridación apropiadas está dentro del alcance del experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Maniatis y col., anteriormente; DNA Cloning, Vols. I & II, anteriormente; Nucleic Acid Hybridization, anteriormente.

- 15 **[0090]** Se debe apreciar que también están dentro del alcance de la presente invención las secuencias de ADN que codifican los péptidos de receptor de la presente invención que codifican un anticuerpo que tiene la misma secuencia de aminoácidos como cualquiera de las SEQ ID NO: 1-10, y que pueden degenerarse entre sí. Por "degeneración" se refiere a que se usa un codón de tres letras diferente para especificar un aminoácido particular. Se conoce bien en la técnica que se pueden usar los siguientes codones indistintamente para codificar cada aminoácido específico:

20

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

[0091] Se debe entender que los codones que se han especificado anteriormente son para las secuencias de ARN. Los correspondientes codones para ADN tienen U sustituido por T.

- 25 **[0092]** Se pueden realizar mutaciones en secuencias de ADN que codifican cualquiera de las SEQ ID NO: 1-14 de manera que se cambia un codón por un codón que codifica un aminoácido diferente. Tal mutación se realiza generalmente realizando los menores cambios de nucleótidos posibles. Se puede realizar una mutación por sustitución de esta clase para cambiar un aminoácido de la proteína resultante de una manera no conservativa (es decir, cambiando el codón de un aminoácido perteneciente a un agrupamiento de aminoácidos que tiene un tamaño concreto o característico por un aminoácido perteneciente a otro agrupamiento) o de una manera conservativa (es decir, cambiando el codón de un aminoácido perteneciente a un agrupamiento de aminoácidos que tiene un tamaño concreto o característico por un aminoácido perteneciente al mismo agrupamiento). Tal cambio conservativo conduce generalmente a un cambio menor en la estructura y función de la proteína resultante. Es más probable que un cambio no conservativo altere la estructura, actividad o función de la proteína resultante. Se debe considerar que la presente invención incluye secuencias que contienen cambios conservativos que no alteran significativamente la actividad o características de unión de la proteína resultante.

[0093] Lo siguiente es un ejemplo de diferentes agrupamientos de aminoácidos:

Aminoácidos con grupos R no polares

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

5

Aminoácidos con grupos R polares no cargados

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

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

Ácido Aspártico, Ácido Glutámico

Aminoácidos básicos (cargados positivamente a pH 6,0)

15

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

[0094] Otros agrupamientos pueden ser aquellos aminoácidos con grupos fenilo:

20 Fenilalanina, Triptófano, Tirosina

[0095] Otro agrupamiento puede ser de acuerdo con el peso molecular (es decir, el tamaño de los grupos R):

Glicina	75
Alanina	89
Serina	105
Prolina	115
Valina	117
Treonina	119
Cisteína	121
Leucina	131
Isoleucina	131
Asparagina	132
Ácido aspártico	133
Glutamina	146
Lisina	146
Ácido glutámico	147
Metionina	149
Histidina (a pH 6,0)	155
Fenilalanina	165
Arginina	174
Tirosina	181
Triptófano	204

25 **[0096]** Las sustituciones particularmente preferidas son:

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

35 **[0097]** También pueden introducirse sustituciones de aminoácidos para sustituir un aminoácido con una propiedad particularmente preferible. Por ejemplo, se puede introducir una Cys en un sitio potencial para puentes disulfuro con otra Cys. Se puede introducir una His como un sitio particularmente "catalítico" (es decir, His puede actuar como un ácido o base y es el aminoácido más común en la catálisis bioquímica). Se puede introducir Pro debido a su estructura particularmente plana, que induce giros - en la estructura de la proteína.

[0098] Dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" cuando al menos aproximadamente el 70% de los restos aminoacídicos (preferiblemente al menos aproximadamente el 80%, y mucho más preferiblemente al menos aproximadamente el 90 o el 95%) son idénticos, o representan sustituciones conservativas.

5

[0099] Una región "heteróloga" del patrón de ADN es un segmento identificable de ADN dentro de una molécula de ADN más grande que no se encuentra asociado con la molécula más grande en la naturaleza. Por lo tanto, cuando la región heteróloga codifica un gen de mamífero, el gen estará flanqueado normalmente por ADN que no flanquea el ADN genómico de mamífero en el genoma del organismo de origen. Otro ejemplo de secuencia codificante heteróloga es un patrón en el que la propia secuencia codificante no se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, un ADNc donde la secuencia codificante genómica contiene intrones, o secuencias sintéticas que tienen codones diferentes a los del gen nativo). Las variaciones alélicas o los eventos mutacionales de origen natural no dan lugar a una región heteróloga de ADN como se define en el presente documento.

15 **[0100]** Una secuencia de ADN está "conectada operativamente" a una secuencia de control de la expresión cuando la secuencia de control de la expresión controla y regula la transcripción y traducción de esa secuencia de ADN. La expresión "conectado operativamente" incluye que tiene una señal de inicio apropiada (por ejemplo, ATG) delante de la secuencia de ADN que se va a expresar y que mantiene el marco de lectura correcto para permitir la expresión de la secuencia de ADN bajo el control de la secuencia de control de la expresión y la producción del producto deseado codificado por la secuencia de ADN. Si el gen que se desea insertar en una molécula de ADN recombinante no contiene una señal de inicio apropiada, tal señal de inicio se puede insertar delante del gen.

25 **[0101]** La expresión "condiciones de hibridación convencionales" se refiere a condiciones de sal y temperatura sustancialmente equivalentes a 5 x SSC y 65 °C tanto para la hibridación como para el lavado. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que dichas "condiciones de hibridación convencionales" dependen de condiciones particulares que incluyen la concentración de sodio y magnesio en el tampón, la longitud y concentración de la secuencia de nucleótidos, el porcentaje de emparejamiento erróneos, el porcentaje de formamida, y similares. También es importante en la determinación de las "condiciones de hibridación convencionales" si las dos secuencias que hibridan son ARN-ARN, ADN-ADN o ARN-ADN. Tales condiciones de hibridación convencionales se determinan fácilmente por un experto en la técnica de acuerdo con fórmulas bien conocidas, en las que la hibridación es típicamente 10-20 °C más baja que la T_m pronosticada o determinada con lavados de mayor restricción, si se desea.

35 **[0102]** Un "anticuerpo" es cualquier inmunoglobulina, incluyendo anticuerpos y fragmentos de la misma, que se enlaza con un epítipo específico. El término incluye anticuerpos policlonales, monoclonales y quiméricos, los últimos mencionados descritos con más detalle en las Patentes de Estados Unidos N° 4.816.397 y 4.816.567. Puesto que los anticuerpos pueden modificarse de varias maneras, ha de interpretarse que el término "anticuerpo" incluye cualquier molécula o sustrato que tiene un dominio de unión con la especificada requerida. Por lo tanto, este término incluye fragmentos de anticuerpos, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, incluyendo cualquier polipéptido que comprenda un dominio de unión a inmunoglobulina, ya sea natural o total o parcialmente sintético. Por lo tanto, se incluyen moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión a inmunoglobulina, o equivalente, condensado a otro polipéptido. La clonación y la expresión de anticuerpos quiméricos se describen en los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023 y las Patentes de Estados Unidos N° 4.816.397 y 4.816.567.

45 **[0103]** Se ha mostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de unir antígenos. Los ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward, E.S. y col., Nature 341, 544-546 (1989)) que consiste en un dominio VH; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos, (vii) moléculas FV de cadena sencilla (scFv), donde un dominio VH y un dominio VL se unen por un engarce peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno (Bird y col., Science, 242, 423-426, 1988; Huston y col., PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988); (viii) fragmentos de anticuerpos multivalente (dímeros scFv, trímeros y/o tetrámeros (Power y Hudson, J Immunol. Methods 242: 193-204 9 (2000)); (ix) dímeros de Fv de cadena sencilla biespecíficos (documento PCT/US92/09965) y (x) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión génica (documento WO94/13804; P. Holliger y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, (1993)).

[0104] Un "sitio de combinación de un anticuerpo" es aquella porción estructural de una molécula de anticuerpo comprendida por regiones variables e hipervariables de la cadena ligera o la cadena pesada y ligera que se une específicamente al antígeno.

[0105] La frase "molécula de anticuerpo" en sus diferentes formas gramaticales como se usa en el presente documento, contempla tanto una molécula de inmunoglobulina intacta como una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina.

5

[0106] Las moléculas de anticuerpo ilustrativas son moléculas de inmunoglobulina intactas, moléculas de inmunoglobulina esencialmente intactas y aquellas porciones de una molécula de inmunoglobulina que contienen el paratopo, incluyendo aquellas porciones conocidas en la técnica como Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v), cuyas porciones se prefieren para su uso en los procedimientos terapéuticos descritos en el presente documento. Las porciones Fab y F(ab')₂ de las moléculas de anticuerpo se preparan mediante la reacción proteolítica de papaína y pepsina, respectivamente, en moléculas de anticuerpo sustancialmente intactas mediante procedimientos que se conocen bien. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.342.566 de Theofilopolous y col. Las porciones de la molécula de anticuerpo Fab' también se conocen bien y se producen a partir de porciones F(ab')₂ seguido de reducción de los enlaces disulfuro que unen las dos porciones de la cadena pesada con mercaptoetanol, y seguido de alquilación del mercaptano de la proteína resultante con un reactivo tal como yodoacetamida. En el presente documento se prefiere un anticuerpo que contiene moléculas de anticuerpo intactas.

[0107] La expresión "anticuerpo monoclonal" en sus diversas formas gramaticales se refiere a un anticuerpo que tiene solamente una especie de sitio de combinación del anticuerpo capaz de inmunorreaccionar con un antígeno particular. Un anticuerpo monoclonal presenta de ese modo una única afinidad de unión por cualquier antígeno con el que inmunorreacciona. Por lo tanto, un anticuerpo monoclonal también puede contener una molécula de anticuerpo que tenga una pluralidad de sitios de combinación de anticuerpos, cada uno inmuno-específico para un antígeno diferente; por ejemplo, un anticuerpo monoclonal biespecífico (químérico).

[0108] La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y no producen típicamente una reacción alérgica o perjudicial similar, tal como trastorno gástrico, mareo y similares, cuando se administran a un ser humano.

[0109] La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se usa en el presente documento para representar una cantidad suficiente para evitar, y preferiblemente reducir en al menos aproximadamente el 30 por ciento, más preferiblemente en al menos el 50 por ciento, mucho más preferiblemente en al menos el 90%, un cambio clínicamente significativo en el tamaño o en la actividad de fase S de una masa celular diana, u otra característica de patología, tal como, por ejemplo, respuesta del anticuerpo, respuesta de linfocitos T o linfocitos B, reducción en la expresión de EGFR.

35

[0110] El término "adyuvante" se refiere a un compuesto o mezcla que potencia la respuesta inmunológica, particularmente a un antígeno. Un adyuvante puede servir como una reserva de tejido que libera lentamente el antígeno y también como un activador del sistema linfático que no potencia específicamente la respuesta inmunológica (Hood y col., *Immunology, Second Ed.*, 1984, Benjamin/Cummings: Menlo Park, California, pág. 3-84). A menudo, un estímulo primario con un único antígeno, en ausencia de un adyuvante no podrá obtener una respuesta inmunológica humoral o celular. Los adyuvantes previamente conocidos y utilizados incluye, pero sin limitación, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, saponina, geles minerales, tales como el hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas, tales como la lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite o hidrocarburos, hemocianina de lapa californiana, dinitrofenol, y un adyuvante humano potencialmente útil, tal como BGG (*bacille Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum*. Los adyuvantes de sales minerales incluyen, pero sin limitación: hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, fosfato cálcico, hidróxido de cinc e hidróxido cálcico. Preferiblemente, la composición de adyuvante comprende adicionalmente un lípido de emulsión de grasa que comprende aproximadamente el 10% (en peso) de aceite vegetal y aproximadamente el 1-2% (en peso) de fosfolípidos. Preferiblemente, la composición de adyuvante adicionalmente comprende opcionalmente una forma de emulsión que tiene partículas oleosas dispersas en una fase acuosa continua, que tiene un poliol de formación de emulsión en una cantidad de aproximadamente el 0,2% (en peso) a aproximadamente el 49% (en peso), opcionalmente un aceite metabolizable en una cantidad de formación de emulsión de hasta el 15% (en peso), y opcionalmente un tensioactivo con base de glicol éter en una cantidad de estabilización de emulsión de hasta aproximadamente el 5% (en peso). Otros ejemplos de adyuvantes incluyen monofosforil lípido A (MPL, SmithKline Beecham), un congénere obtenido después de la purificación y la hidrólisis ácida de liposacárido de *Salmonella Minnesota* Re 595; saponinas que incluyen QS21 (SmithKline Beecham), una saponina QA-21 pura purificada en extracto de Quillja saponaria; DQS21, descrito en la solicitud PCT WO96/33739 (SmithKline Beecham); ISCOM (CSL Ltd., Parlcville, Victoria, Australia) obtenido a partir de la corteza del árbol Quillaia saponaria molina; QS-7, QS-17, OS-18 y QS-L1 (So y col., Mol. Cells 7:178-186, 1997); montanide; alum;

oligonucleótidos CpG (véase, por ejemplo, Kreig y col., Nature 374:546-9, 1995); diversas emulsiones de agua en aceite preparadas a partir de aceites biodegradables, tales como escualeno y/o tocoferol; y factores que se toman por el denominado "receptor 7 de tipo Toll" en ciertas células inmunes que se encuentran en la parte externa de la piel, tal como imiquimod (3M, St. Paul, Minnesota). Particularmente, los antígenos pueden administrarse mezclados con una combinación de DQS21/MPL. La relación de DQS21 con respecto a MPL será típicamente de aproximadamente 1:10 a 10:1, preferiblemente de aproximadamente 1:5 de 5:1, y más preferiblemente aproximadamente 1:1. Típicamente para administración en seres humanos, DQS21 y MPL estarán presentes en una formulación de vacuna en el intervalo de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 100 µg. Se conocen en la técnica otros adyuvantes y pueden usarse en la invención (véase, por ejemplo, Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2ª Ed., 1986). Se conocen bien procedimientos para la preparación de mezclas o emulsiones de polipéptido o adyuvante por los expertos en la técnica en la inducción y/o mejora de una respuesta inmune y la técnica de la vacunación.

[0111] Como se usa en el presente documento, el término "inmunomodulador" se refiere a un agente que es capaz de modular una respuesta inmune o una respuesta inmunológica. Tal modulación incluye la mejora de la producción de anticuerpos, de la respuesta humoral, de la respuesta inmune celular. Los ejemplos de inmunomoduladores incluyen, pero sin limitación, adyuvantes, citocinas, interleucinas, quimiocinas y factores de crecimiento.

[0112] La expresión "cantidad eficaz" de un inmunomodulador se refiere a una cantidad de un inmunomodulador suficiente para potenciar una respuesta inmune inducida por una vacuna, que será mediada por células, humoral o mediada por anticuerpos. Una cantidad eficaz de un inmunomodulador, si se inyecta, puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1-1.000 µg, preferiblemente 1-900 µg, más preferiblemente 5-500 µg, para un sujeto humano, o en el intervalo de aproximadamente 0,01-10,0 µg/Kg de peso corporal del sujeto animal. Esta cantidad puede variar en cierto grado dependiendo del modo de administración, pero estará en el mismo intervalo general. Si se usa más de un inmunomodulador, cada uno puede estar presente en estas cantidades o la cantidad total puede estar dentro de este intervalo. Una cantidad eficaz de un antígeno puede ser una cantidad capaz de provocar una respuesta inmune demostrable en ausencia de un inmunomodulador. La cantidad apropiada de antígeno que se va a usar depende del antígeno específico y se conoce bien en la técnica.

[0113] La cantidad eficaz exacta necesaria variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, la edad y el estado general del sujeto, la gravedad del estado que se está tratando, el modo de administración, etc. Por tanto, no es posible especificar una cantidad eficaz exacta. Sin embargo, la cantidad eficaz apropiada puede determinarse por un experto en la técnica usando únicamente la experimentación de rutina o los conocimientos previos en la técnica de la vacunación.

[0114] Una "respuesta inmunológica" a una composición o vacuna comprendida por un antígeno es el desarrollo en el huésped de una respuesta inmune mediada por células y/o anticuerpos con respecto a la composición o vacuna de interés. Normalmente, tal respuesta consiste en sujeto que produce anticuerpos, linfocitos B, linfocitos T auxiliares, linfocitos T supresores, y/o linfocitos T citotóxicos dirigidos específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés.

[0115] Como se usa en el presente documento, "pg" significa picogramo, "ng" significa nanogramo, "ug" o "µg" significan microgramos, "mg" significa miligramo, "ul" o "µl" significan microlitro, "ml" significa mililitro, "l" significa litro.

[0116] La expresión "expresión aberrante" en sus diversas formas gramaticales puede significar e incluir cualquier expresión aumentada o alterada o sobreexpresión de una proteína en un tejido, por ejemplo, un incremento en la cantidad de una proteína, causado por cualquier procedimiento que incluya un aumento de la expresión o traducción, una modulación del promotor o un regulador de la proteína, una amplificación de un gen de una proteína, o un aumento de la semivida o la estabilidad, de manera que existe o se puede detectar en cualquier momento más proteína, a diferencia de un estado sin sobreexpresión. La expresión aberrante incluye y contempla cualquier escenario o alteración en el que la expresión de la proteína o la maquinaria de modificación post-traducciona en una célula se exige o se interrumpe de otro modo debido a un aumento de la expresión o a un incremento de los niveles o cantidades de una proteína, incluyendo cuando se expresa una proteína alterada, en forma de una proteína mutada o variante debido a una alteración, delección o inserción de la secuencia, o a un plegamiento alterado.

[0117] Es importante apreciar que la expresión "expresión aberrante" se ha seleccionado específicamente en el presente documento para incluir el estado en el que están presentes cantidades/niveles anormales (normalmente aumentados) de la proteína, con independencia de la causa eficaz de esa cantidad o nivel anormal. Por lo tanto, las

cantidades anormales de proteína puede resultar de la expresión en exceso de la proteína en ausencia de amplificación del gen, que es el caso, por ejemplo, en muchas muestras de células/tejidos tomadas de la cabeza y el cuello de sujetos con cáncer, mientras otras muestras exhiben niveles anormales de proteína atribuibles a amplificación génica.

5

[0118] Con respecto a esto último, algunos de los trabajos de los inventores que se presentan en el presente documento para ilustrar la invención incluyen el análisis de muestras, algunas de las cuales muestran niveles de proteína anormales resultantes de la amplificación de un receptor de factor de crecimiento, incluyendo un receptor de la familia de EGF, particularmente incluyendo EGFR. Por lo tanto, esto explica la presentación en el presente documento de hallazgos experimentales en los que se hace referencia a la amplificación y el uso de los términos "amplificación/amplificado" y similares al describir niveles anormales del receptor del factor de crecimiento, el receptor de la familia de EGF, EGFR. No obstante, es la observación de las cantidades o niveles anormales de la proteína la que define el entorno o la circunstancia en la que se contempla la intervención clínica como recurso para los miembros de unión de la divulgación, y por esta razón, la presente memoria descriptiva considera que la expresión "expresión aberrante" capta más ampliamente el entorno causal que produce la correspondiente anomalía en los niveles del receptor de factor de crecimiento, receptor de la familia de EGF, EGFR.

[0119] Por consiguiente, mientras se entiende que los términos "sobreexpresión" y "amplificación" en sus diversas formas gramaticales tienen significados técnicos distintos, se deben considerar equivalentes entre sí, en tanto que representan el estado en el que están presentes los niveles anormales de proteína del receptor de factor de crecimiento, receptor de la familia de EGF, EGFR en el contexto de la presente invención. En consecuencia, la expresión "expresión aberrante" se ha seleccionado ya que se cree que subsume las expresiones "sobreexpresión" y "amplificación" dentro de su alcance para los fines en el presente documento, de manera que todas las expresiones puedan considerarse equivalentes entre sí como se usan en el presente documento.

25

[0120] La presente invención se refiere a epítopos de receptor, particularmente epítopos de receptor del factor de crecimiento, que pueden utilizarse en la generación de anticuerpos que tienen capacidad y actividad anti-tumoral o que estimulan una respuesta inmunológica que es una respuesta anti-tumoral. Los epítopos de receptor del factor de crecimiento incluyen epítopos de bucle que se exponen en formas transitorias del receptor del factor de crecimiento y son capaces de generar anticuerpos que reconocen formas transitorias del receptor, modulando de este modo, incluyendo evitando o inhibiendo, su activación, incluyendo el cambio de una confirmación unida a ligando inactiva o activa. La invención proporciona epítopos de receptor, particularmente epítopos de receptor de la familia de EGF, mucho más particularmente epítopos de EGFR, que pueden utilizarse en la generación de anticuerpos que tienen capacidad y actividad anti-tumoral o que estimulan una respuesta inmunológica que es una respuesta anti-tumoral. En un aspecto general, la invención proporciona un epítipo de receptor, particularmente un epítipo del receptor de EGF o un epítipo de la familia del receptor de EGF, que se encuentra en las células tumorigénicas, hiperproliferativas o anormales y no es detectable o transitorio en células normales o de tipo salvaje.

[0121] La presente invención describe la existencia o exposición de un péptido epitópico, particularmente un péptido de bucle, que está unido en cada extremo N-terminal y C-terminal por una cisteína, formando un péptido de bucle de disulfuro, en un receptor del factor de crecimiento, particularmente el EGFR. Este péptido de bucle se expone a una conformación amarrada transitoria, y su presencia o cantidad se altera o se aumenta en casos que incluyen la producción del ligando autocrino (el ligando impulsa el EGFR hacia los dímeros activos), la activación del receptor independiente de ligando (un evento restringido en gran medida a células que sobreexpresan el receptor), alteraciones en la glicosilación que alteran el nivel de libertad o una combinación de cualquiera de estas posibilidades.

[0122] Aunque la homología de secuencia del epítipo 287-302 del bucle EGFR mAb806 (CGADSYEMEEEDGVRKC (SEQ ID NO: 1)) es relativamente baja en los miembros de la familia de EGF ErbB3 y ErbB4, se conservan el tamaño y la ubicación del bucle de cisteína. Además, hay dos restos aminoácidos completamente conservados (E293 y G298) y dos adicionales donde se conserva la carga (E295 y R300). Finalmente, la estructura general de ErbB3 (y probablemente ErbB4), es muy similar a la del EGFR en que adopta una conformación amarrada que se libera presumiblemente durante la activación (Cho, H.S. and Leahy, D.J. (2002) Science 297: 1330-1333). Por lo tanto, en el presente documento se proporcionan anticuerpos dirigidos al bucle de cisteína equivalente en ErbB3/B4 como útiles al tener propiedades similares a mAb 806 (es decir, especificidad restringida a tumores y la capacidad de bloquear la activación del receptor). Más ampliamente, la generación de anticuerpos para las formas transicionales de los receptores del factor de crecimiento representa una manera novedosa de reducción del direccionamiento del tejido normal que aún conserva actividad anti-señalización.

[0123] La TABLA 1 que se muestra a continuación proporciona una comparación de la secuencia bucle de miembros de la familia de EGF EGFR, ErbB2, ErbB3 y ErbB4.

TABLA 1

EGFR	C	G	A	D	S	Y	E	M	E	E	D	G	V	R	K	C	
ERBB2	C	P	L	H	N	Q	E	V	T	A	E	D	G	T	Q	R	C
ERBB3	C	P	P	D	K	M	E	V	D		K	N	G	L	K	M	C
ERBB4	C	P	S	S	K	M	E	V	E		E	N	G	I	K	M	C

Posiciones con propiedades fisicoquímicas conservadas de aminoácidos en recuadros

- 10 **[0124]** Además, una búsqueda Genbank BLAST que utiliza el epítipo 287-302 del bucle EGFR mAb806 (CGADSYEMEEEDGVRC (SEQ ID NO: 1)) identifica alelos naturales y variantes de esta secuencia peptídica de epítipos en bucle en diversos EGFR de mamífero (TABLA 2).

TABLA 2

<i>Péptido de ECF</i>	C	G	A	D	S	Y	E	M	E	E	D	G	V	R	K	C
EGFR de ratón, etc.																
gi 1352359					P	Y		V					I			
gi 458123 y gi 12836452																
EGFR de pollo																
gi 119223			N	T		T		V			N					
Conejo																
gi 13173350					P			V								
gi 13173351																
Cerdo																
gi 21913175			S	S				V								
gi 21913176																
EGF														A		
gi 224020																

[0125] De acuerdo con la presente invención, se proporcionan péptidos de receptor del factor de crecimiento, particularmente péptidos de EGFR que son capaces de generar anticuerpos, particularmente anticuerpos monoclonales, que tienen actividad anti-tumoral.

[0126] De acuerdo con la presente invención, se proporcionan péptidos de receptor del factor de crecimiento, particularmente péptidos de EGFR que son capaces de generar anticuerpos que son capaces de reconocer el EGFR que se encuentra en las células tumorigénicas, hiperproliferativas o anormales y no es detectable o transitorio en células normales o de tipo salvaje.

[0127] Los péptidos de receptor del factor de crecimiento, particularmente los péptidos de receptor de la familia de EGF, de la presente invención proporcionan usos diagnósticos y terapéuticos para identificar, caracterizar y marcar varios tipos de tumores, por ejemplo, tumores de cabeza y cuello, mama, pulmón, vejiga, colon o próstata y glioma, sin los problemas asociados con captación del tejido normal que pueden observarse con el receptor del factor de crecimiento conocido previamente, incluyendo EGFR, anticuerpos.

[0128] La presente invención incluye polipéptidos aislados; que consisten en una secuencia aminoacídica

seleccionada entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-10. La presente invención incluye adicionalmente variantes o mutantes de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-10, donde uno o más aminoácidos están sustituidos, incluyendo por un aminoácido conservativo o no conservativo. Se incluye en la presente invención cualquiera de dicho péptido variante o mutante que sea capaz de reconocer o unirse por el anticuerpo mAb 806, o un anticuerpo recombinante o sintético
 5 obtenido a partir del mismo, o que sea capaz de generar uno o más anticuerpos que tengan una característica de mAb806. En particular, cualquiera de dicho péptido o péptidos pueden ser capaces de generar anticuerpos que reconocen el receptor del factor de crecimiento y tienen actividad anti-tumoral. Los péptidos aislados, incluyendo combinaciones de uno o más de los mismos son adecuados para su uso en la generación de anticuerpos que reconocen el receptor del factor de crecimiento y tienen actividad anti-tumoral y en la inmunización de animales,
 10 particularmente mamíferos, mucho más particularmente seres humanos, que tienen cáncer o una enfermedad tumoral.

[0129] Como se ha indicado anteriormente, la presente invención también se refiere a una molécula de ADN recombinante o un gen clonado, o una variante degenerada de los mismos, que codifica un epítipo del receptor del
 15 factor de crecimiento que consiste en una secuencia aminoacídica expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-10; preferiblemente una molécula de ácidos nucleicos, en particular una molécula de ADN recombinante o un gen clonado, que codifica el epítipo del receptor de la familia de EGF seleccionado entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-10.

[0130] Como se ha analizado anteriormente, los epítopos del receptor de la familia de EGF o los fragmentos inmunogénicos de los mismos, particularmente seleccionados entre un epítipo del receptor de EGF de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-14, pueden prepararse en composiciones farmacéuticas, con un portador adecuado y una fuerza eficaz para la administración mediante diversos medios a un paciente que tiene un tumor o cáncer para el tratamiento del mismo. Puede utilizarse una diversidad de técnicas administrativas, entre ellas técnicas parenterales,
 25 tales como inyecciones subcutáneas, intravenosa e intraperitoneal, cateterizaciones y similares. Las cantidades medias del péptido o péptidos o fragmentos inmunogénicos de los mismos pueden variar y, en particular, deben basarse en las recomendaciones y la prescripción de un médico o veterinario cualificado.

Anticuerpos

[0131] La divulgación proporciona un anticuerpo purificado para un péptido de receptor de la familia de EGF seleccionado entre cualquiera de las SEQ ID NO: 1-14.

[0132] Los anticuerpos contra los polipéptidos aislados de la presente invención incluyen anticuerpos surgidos de
 35 manera natural y preparados de manera recombinante. Estos pueden incluir tanto anticuerpos policlonales como monoclonales preparados por técnicas genéticas conocidas, así como anticuerpos biespecíficos y anticuerpos que incluyen otras funcionalidades que los adecuan para su uso en diagnóstico. Dichos anticuerpos pueden usarse terapéuticamente para tratar pacientes con tumores que tienen una expresión aberrante del EGFR o cualquiera de sus miembros de la familia, incluyendo, pero sin limitación, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de
 40 pulmón, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de laringe, carcinoma de células escamosas, o tumores de próstata y glioma. Dichos anticuerpos también pueden usarse en inmunoensayos para caracterizaron tumores o diagnosticar cáncer, incluyendo cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de laringe, carcinoma de células escamosas, o tumores de próstata y glioma. Los anticuerpos también pueden usarse para la inmunización pasiva con el fin de reducir o tratar un cáncer incluyendo
 45 cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de laringe, carcinoma de células escamosas, o tumores de próstata y glioma.

[0133] Asimismo, los anticuerpos que incluyen anticuerpos tanto policlonales como monoclonales, y los fármacos que modulan la exposición o actividad de los péptidos epitópicos de receptor y/o sus subunidades pueden poseer
 50 ciertas aplicaciones diagnósticas y se pueden utilizar, por ejemplo, con el fin de detectar y/o medir afecciones tales como invención vírica o similares. Por ejemplo, los péptidos de receptor o fragmentos inmunogénicos de los mismos se pueden usar para producir anticuerpos tanto policlonales como monoclonales en una diversidad de medios celulares, mediante mecanismos conocidos tales la técnica del hibridoma que utiliza, por ejemplo, linfocitos de bazo de ratón y células de mieloma fusionados. Del mismo modo, se pueden descubrir o sintetizar pequeñas moléculas
 55 que imitan o tienen un efecto antagónico sobre la actividad o las actividades de los péptidos de receptor o bucles de epítopos de la invención, y se pueden usar en protocolos diagnósticos y/o terapéuticos.

[0134] Los paneles de anticuerpos monoclonales producidos contra los péptidos de receptor pueden cribarse en busca de diversas propiedades; es decir, isotipo, epítipo, afinidad, etc. Tienen un interés particular los anticuerpos

monoclonales que neutralizan o modulan la actividad del receptor. Dichos monoclonales pueden identificarse fácilmente en ensayos de actividad del receptor o señalización o en ensayos de tumorigenicidad. Los anticuerpos de alta afinidad también son útiles cuando se desea la purificación por inmunofinidad de un receptor del factor de crecimiento mutante, incluyendo EGFR, o un receptor constitutivamente activo.

5

[0135] Particularmente, el anticuerpo peptídico anti-receptor usado en los procedimientos diagnósticos de esta divulgación puede ser un anticuerpo policlonal purificado por afinidad. Más preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal (mAb). Además, las moléculas de anticuerpo peptídico anti-receptor usadas en el presente documento pueden estar en forma de porciones Fab, Fab', F(ab')₂ o F(v) de moléculas de anticuerpos completos. Se prefieren particularmente y se proporcionan anticuerpos sintéticos, humanizados, recombinantes o completamente humanos.

10

[0136] Se conocen bien en la técnica usos terapéuticos de los anticuerpos. Existen varias maneras de usar los anticuerpos para fines terapéuticos, por ejemplo, como anticuerpo sin tratar en combinación con fármacos quimioterapéuticos conocidos, como anticuerpos radiomarcados para radioinmunoterapia, o como anticuerpos conjugados/acoplados con fármacos citotóxicos, toxinas u otros agentes tóxicos.

15

[0137] Los anticuerpos radiomarcados y fragmentos de los mismos, particularmente los radioinmunoconjugados, son útiles en radioinmunoterapia, particularmente como anticuerpos radiomarcados para la terapia contra el cáncer. En un aspecto adicional, los anticuerpos radiomarcados y fragmentos de los mismo son útiles en las técnicas de cirugía radioinmuno-guiada, donde pueden identificar e indicar la presencia y/o localización de células cancerosas, células precancerosas, células tumorales y células hiperproliferativas, antes de, durante o después de la cirugía para eliminar tales células

20

[0138] Los productos inmunoconjugados o las proteínas de fusión de la divulgación, donde los anticuerpos y fragmentos de los mismos, de la divulgación se conjugan o se unen a otras moléculas o agentes incluyen adicionalmente, pero sin limitación, miembros de unión conjugados con un agente de ablación química, toxina, inmunomodulador, citocina, agente citotóxico, agente quimioterapéutico o fármaco.

25

[0139] Los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos, de la divulgación pueden administrarse en solitario o en combinación con otros tratamientos, productos terapéuticos o agentes, simultánea o secuencialmente dependiendo de la afección a tratar. Además, la divulgación contempla e incluye composiciones que comprenden el anticuerpo o fragmento del mismo, descritas en el presente documento y otros agentes o productos terapéuticos, tales como agentes anti-cancerosos o terapéuticos, hormonas, agentes o anticuerpos anti-EGFR, o moduladores inmunitarios. Más generalmente estos agentes anticancerosos pueden ser inhibidores de tirosina cinasa, inhibidores de la cascada de fosforilación, moduladores post-traduccionales, inhibidores del crecimiento o la división celular (por ejemplo, anti-mitóticos), o inhibidores de transducción de señal. Otros tratamientos o agentes terapéuticos pueden incluir la administración de dosis adecuadas de fármacos de fármacos que alivian el dolor tales como los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (por ejemplo aspirina, paracetamol, ibuprofeno o cetoprofeno) u opiáceos tales como morfina, o anti-eméticos. La composición puede administrarse en combinación (secuencialmente (es decir, antes o después) o simultáneamente) con inhibidores de la tirosina cinasa (incluyendo, pero sin limitación, AG1478 y ZD1839, STI571, OSI-774, SU-6668), doxorrubicina, temozolomida, cisplatino, carboplatino, nitrosoureas, procarbazona, vincristina, hidroxiaurea, 5-fluoruracilo, citosina arabinosida, ciclofosfamida, epipodofilotoxina, carmustina, lomustina, y/o otros agentes quimioterapéuticos. Por lo tanto, estos agentes pueden ser agentes específicos anti-EGFR, o inhibidores de la tirosina cinasa tales como AG1478, ZD1839, STI571, OSI-774 o SU-6668 o pueden ser agentes anticancerosos y antineoplásicos generales tales como doxorrubicina, cisplatino, temozolomida, nitrosoureas, procarbazona, vincristina, hidroxiaurea, 5-fluoruracilo, citosina arabinosida, ciclofosfamida, epipodofilotoxina, carmustina, o lomustina. Además, la composición puede administrarse con hormonas, tales como dexametasona, moduladores inmunes, tales como interleucinas, factor de necrosis tumoral (TNF), factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) u otros factores de crecimiento o citocinas que estimulan la respuesta inmune y la reducción o eliminación de células cancerosas o tumores. Un modulador inmune tal como TNF puede combinarse junto con un miembro de la divulgación en forma de un anticuerpo biespecífico que reconoce el epítipo 806 EGFR, así como la unión a los receptores TNF. La composición también puede administrarse con, o puede incluir combinaciones junto con otros anticuerpos anti-EGFR, incluyendo, pero sin limitación, los anticuerpos anti-EGFR 528,225, SC-03, DR8.3, L8A4, Y10, ICR62 y ABX-EGF.

30

35

40

45

50

55

[0140] Previamente el uso de agentes tales como doxorrubicina y cisplatino junto con anticuerpos anti-EGFR había producido una mejora de la actividad anti-tumoral (Fan y col., 1993; Baselga y col., 1993). La combinación de doxorrubicina y mAb 528 dio como resultado la erradicación total de xenoinjertos A431 establecidos, mientras el

tratamiento con cualquier agente en solitario causaba únicamente una inhibición temporal del crecimiento in vivo (Baselga y col., 1993). Del mismo modo, la combinación de cisplatino y cualquiera de mAb 528 o 225 también condujo a la erradicación de xenoinjertos A431 bien establecidos, que no se había observado al utilizar el tratamiento con cualquier agente (Fan y col., 1993).

5

[0141] Como se ha sugerido anteriormente, el procedimiento diagnóstico de la divulgación comprende examinar una muestra o medio celular mediante un ensayo que incluye una cantidad eficaz de un antagonista para un péptido de epítomos de receptor, tal como un anticuerpo peptídico anti-receptor, preferiblemente un anticuerpo policlonal purificado por afinidad, y más preferiblemente un mAb. Como se ha analizado previamente, los pacientes capaces de beneficiarse de este procedimiento incluyen aquellos que padecen tumores, cáncer, una lesión precancerosa, u otra afección del receptor del factor de crecimiento. Se conocen bien en la técnica procedimientos para inducir anticuerpos peptídicos anti-receptor y para determinar y optimizar la capacidad de los anticuerpos peptídicos anti-receptor para facilitar el examen, el aislamiento, y el reconocimiento o muerte de las células diana, particularmente células tumorales o tumorigénicas o cancerosas.

15

[0142] Se conocen bien en la técnica procedimientos para producir anticuerpos peptídicos anti-receptor policlonales. Véase la patente de Estados Unidos N° 4.493.795 de Nestor y col. Puede prepararse un anticuerpo monoclonal, que contiene típicamente porciones Fab y/o F(ab')₂ de moléculas de anticuerpo útiles, usando la tecnología de hibridoma descrita en Antibodies - A Laboratory Manual, Harlow and Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1988).

20

[0143] En resumen, para formar el hibridoma a partir del cual se produce la composición de anticuerpo monoclonal, se fusiona un mieloma u otra línea celular auto-perpetuante con linfocitos obtenidos del bazo de un mamífero hiperinmunizado con un péptido de receptor o un fragmento inmunogénico del mismo.

25

[0144] Los esplenocitos se fusionan típicamente con células de mieloma usando polietilenglicol (PEG) 6000. Los híbridos fusionados se seleccionan por su sensibilidad a HAT. Los hibridomas que producen un anticuerpo monoclonal se identifican por su capacidad para inmunorreaccionar con los presentes péptidos de receptor y su capacidad para inhibir la actividad peptídica de receptor especificada o del receptor en las células diana.

30

[0145] Se puede producir un anticuerpo monoclonal iniciando un cultivo de hibridoma monoclonal que comprende un medio nutriente que contiene un hibridoma que secreta moléculas de anticuerpo con la especificidad antigénica apropiada. El cultivo se mantiene en condiciones y durante un período de tiempo suficiente para que el hibridoma secrete las moléculas de anticuerpo al medio. Después se recoge el medio que contiene el anticuerpo. Las moléculas de anticuerpo se pueden aislar adicionalmente mediante técnicas bien conocidas.

35

[0146] Los medios útiles para la preparación de estas composiciones se conocen bien en la técnica y están disponibles en el mercado e incluyen medios de cultivo sintéticos, ratones endogámicos y similares. Un medio sintético ejemplar es medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM; Dulbecco y col., Virol. 8: 396 (1959)) complementado con 4,5 gm/l de glucosa, glutamina 20 mm, y suero de ternero fetal al 20%. Una cepa de ratón endogámica ilustrativa es Balb/c.

40

[0147] Se conoce bien la metodología general para crear anticuerpos monoclonales por medio de hibridomas. También se pueden crear líneas celulares productoras de anticuerpos inmortales mediante técnicas distintas de la fusión, tales como la transformación directa de linfocitos B con ADN oncogénico, o la transfección con virus Epstein-Barr. Véase, por ejemplo, M. Schreier y col., "Hybridoma Techniques" (1980); Hammerling y col., "Monoclonal Antibodies And T-cell Hybridomas" (1981); Kennett y col., "Monoclonal Antibodies" (1980); véanse también las patentes de Estados Unidos N° 4.341.761; 4.399.121; 4.427.783; 4.444.887; 4.451.570; 4.466.917; 4.472.500; 4.491.632; 4.493.890.

50

[0148] También se conocen bien en la técnica procedimientos para producir anticuerpos peptídicos anti-receptor monoclonales. Véase, Niman y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 4949-4953 (1983). Típicamente, se usa el presente péptido de receptor o un análogo peptídico solo o conjugado con un portador inmunogénico, como el inmunógeno del procedimiento que se ha descrito anteriormente para producir anticuerpos monoclonales del péptido anti-receptor. Los hibridomas se criban para comprobar la capacidad de producir un anticuerpo que reacciona inmunológicamente con el péptido de receptor.

55

[0149] Aparte de la técnica del hibridoma tradicional existen varias técnicas bien conocidas diferentes para la producir anticuerpos monoclonales. Son particularmente útiles, procedimientos para producir anticuerpos totalmente

humanos. Un procedimiento es la tecnología de presentación de fagos que puede usarse para seleccionar un rango de anticuerpos humanos que se unen específicamente al antígeno usando procedimientos de enriquecimiento por afinidad. La presentación de fagos se ha descrito por toda la bibliografía y la construcción y detección de bibliotecas de presentación de fagos se conocen bien en la técnica, véase, por ejemplo, Hoogenboom y col. Trends Biotechnol., 5 15: 62-70 (1997); Hoogenboom, y col. Immunotechnology 4: 1-20 (1998); McGregor y col. Mol. Biotechnol, 6: 155-62 (1996); y Bird y col., Science, 242: 423-426 (1988). También pueden prepararse anticuerpos totalmente humanos por inmunización de ratones transgénicos que llevan grandes porciones de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina humana, con un inmunógeno. Se conocen bien en la técnica ejemplos de dichos ratones, por ejemplo, el Xenomouse® (Abgenix, Inc.) y el HuMAb-Mouse (Medarex, Inc.), véase también las patentes de Estados 10 Unidos Nº 6.207.418, Nº 6.150.584, Nº 6.111.166, Nº 6.075.181, Nº 5.922.545, Nº 5.545.806 y Nº 5.569.825. Después, los anticuerpos pueden prepararse mediante técnicas convencionales, por ejemplo, técnicas de hibridoma convencionales o por presentación de fagos.

[0150] Los anticuerpos monoclonales obtenidos por la técnica de hibridoma a partir de otras especies distintas a la 15 humana, tal como ratón, pueden humanizarse, lo que significa que se creará por ingeniería genética un anticuerpo no humano que será más humano con el fin de evitar HAMA cuando se infunde en seres humanos. Los procedimientos de humanización de los anticuerpos se conocen bien en la técnica, entre los procedimientos más comunes se encuentran injerto en la región determinante de la complementariedad (CDR) y veneering (también conocido como resurfacing). Estos procedimientos se han descrito extensamente en la bibliografía y en las patentes, 20 véase, por ejemplo; King "Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies" Taylor & Francis, 1998: Patentes de Estados Unidos 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089, 5.859.205 y 6.797.492.

[0151] Otra posibilidad en el desarrollo de moléculas que unen/bloquean/marcan o de otro modo interactúan con los epítomos y los receptores correspondientes descritos en el presente documento, es fabricar los péptidos. Estos 25 péptidos pueden ser cualquier péptido al azar que tengan una afinidad para los epítomos y no necesariamente tienen que ser de la familia de las inmunoglobulinas. Estos péptidos a menudo se aíslan mediante técnicas similares como para los anticuerpos de presentación de fagos (Szardenings, J Recept Signal Transduct Res. 2003; 23(4): 307-49). El uso de péptidos de dichas bibliotecas de péptidos aleatorios es similar a los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos.

30 **[0152]** La divulgación también se refiere a una diversidad de aplicaciones diagnósticas, incluyendo procedimientos para detectar la presencia de estímulos, tales como los ligandos polipeptídicos a los que se ha hecho referencia anteriormente, por referencia a su capacidad para provocar las actividades que se media por los presentes péptidos de receptor. Como se ha mencionado anteriormente, el péptido de receptor puede usarse para producir anticuerpos 35 para sí mismo por una diversidad de técnicas conocidas, y dichos anticuerpos después pueden aislarse y utilizarse como en los ensayos para buscar la presencia de actividad particular en células diana sospechosas.

[0153] Como se ha descrito con detalle anteriormente, el anticuerpo o los anticuerpos para el péptido de receptor se pueden producir y aislar mediante métodos convencionales incluyendo las técnicas con hibridomas bien 40 conocidas. Por conveniencia, se hará referencia en el presente documento al anticuerpo o los anticuerpos para el péptido de receptor como anticuerpo o anticuerpos Ab₁ originados en otra especie como Ab₂. A partir de lo anterior se observará que una propiedad característica de Ab₂ es que este reaccionará con Ab₁. Para los fines de esta descripción y de las reivindicaciones, se hará referencia a Ab₁ como un anticuerpo primario o un péptido anti-receptor, y se hará referencia a Ab₂ como un anticuerpo secundario o anti-Ab₁.

45 **[0154]** La presencia de péptido de epítomos de receptor expuesto en las células se puede averiguar mediante los procedimientos inmunológicos habituales aplicables a dichas determinaciones. Se conocen numerosos procedimientos útiles. Tres de dichos procedimientos que son especialmente útiles emplean el péptido de receptor marcado con un marcador detectable, anticuerpo Ab₁ marcado con un marcador detectable, o anticuerpo Ab₂ 50 marcado con un marcador detectable. Los procedimientos se pueden resumir por medio de las siguientes ecuaciones donde el asterisco indica que la partícula está marcada, y "-" representa el péptido de receptor:

$$A. \sim^* + Ab_1 = \sim^*Ab_1$$

55 $B. \sim + Ab^* = \sim Ab_1^*$

$$C. \sim + Ab_1 + Ab_2^* = \sim Ab_1 Ab_2^*$$

[0155] Los procedimientos y su aplicación son familiares para los expertos en la técnica y por consiguiente se

pueden utilizar dentro del alcance de la presente invención. El procedimiento "competitivo", Procedimiento A, se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 3.654.090 y 3.850.752. El Procedimiento C, el procedimiento "sándwich", se describe en la patente de Estados Unidos N° RE 31.006 y 4.016.043. Se conocen otros procedimientos tales como el procedimiento del "anticuerpo doble", o "DASP".

5

[0156] En cada caso, el péptido de receptor forma complejos con uno o más anticuerpos o compañeros de unión y un miembro del complejo se marca con un marcador detectable. El hecho de la formación del complejo, y si se desea, la cantidad del mismo, se puede determinar mediante procedimientos conocidos aplicables a la detección de marcadores.

10

[0157] Las etiquetas más comúnmente empleadas para estos estudios son elementos radiactivos, enzimas, productos químicos que emiten fluorescencia cuando se exponen a la luz ultravioleta, y otros.

[0158] Se conocen y se pueden utilizar como marcadores varios materiales fluorescentes. Estos incluyen, por ejemplo, fluoresceína, rodamina, auramina, Rojo Texas, azul AMCA y Amarillo Lucifer. Un material detector particular es un anticuerpo anti-conejo preparado en cabras y conjugado con fluoresceína a través de un isotiocianato.

[0159] El péptido de receptor o sus compañeros de unión también pueden marcarse con un elemento radiactivo o con una enzima. El marcador radioactivo puede detectarse mediante cualquier procedimiento de recuento disponible actualmente. El isótopo preferido se puede seleccionar entre ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I y ^{186}Re .

[0160] Del mismo modo son útiles los marcadores enzimáticos, y se pueden detectar mediante cualquiera de las técnicas colorimétricas, espectrofotométricas, fluoroespectro-fotométricas, amperométricas o gasométricas utilizadas en la actualidad. La enzima se conjuga con la partícula seleccionada mediante reacción con moléculas formadoras de puentes tales como carbodiimidas, diisocianatos, glutaraldehído y similares. Se conocen y se pueden utilizar muchas enzimas que se pueden usar en estos procedimientos. Se prefieren peroxidasa, β -glucuronidasa, β -D-glucosidasa, β -D-galactosidasa, ureasa, glucosa oxidasa más peroxidasa y fosfatasa alcalina. Se hace referencia a las patentes de Estados Unidos N° 3.654.090; 3.850.752; y 4.016.043 a modo de ejemplo por su divulgación del material y procedimientos de marcado alternativos.

[0161] Se conoce un sistema de ensayo particular desarrollado y utilizado de acuerdo con la presente invención, como un ensayo de receptores. En un ensayo de receptores, el material que se va a ensayar se marca apropiadamente y después ciertas colonias de ensayo celular se inoculan con una cantidad tanto de material marcado como no marcado después de lo cual se realizan estudios de unión para determinar el grado en el que se une el material marcado a los receptores celulares. De este modo, se pueden averiguar las diferencias de afinidad entre los materiales.

[0162] Por consiguiente, se puede marcar radiactivamente y combinar una cantidad purificada del péptido de receptor, por ejemplo, con anticuerpos u otros inhibidores de estos, después de lo cual se realizarán estudios de unión. Después, se preparan soluciones que contienen diferentes cantidades de miembros de péptido de receptor no combinado marcado y no marcado, y después las muestras de células se inocularán y posteriormente se incubarán. Después, las monocapas de células resultantes se lavan, se solubilizan y después se someten a recuento en un contador gamma durante un lapso de tiempo suficiente para producir un error típico de <5%. Después, estos datos se someten a análisis Scatchard después de lo cual se pueden hacer observaciones y sacar conclusiones referentes a la actividad del material. Si bien lo anterior es ilustrativo, ilustra el modo en el que se puede realizar y utilizar un ensayo de receptores, en el caso en el que la capacidad de unión celular del material analizado pueda servir como característica distintiva.

50

[0163] Se conoce como ensayo "cis/trans" un ensayo útil contemplado de acuerdo con la divulgación. En resumen, en este análisis emplea dos patrones genéticos, uno de los cuales es típicamente un plásmido que expresa continuamente un receptor concreto de interés cuando se transfecta a una línea celular apropiada, y el segundo de los cuales es un plásmido que expresa un informador tal como luciferasa, bajo el control de un complejo receptor/ligando. Por lo tanto, por ejemplo, si se desea evaluar un compuesto como ligando para un receptor concreto, uno de los plásmidos será un patrón que da como resultado la expresión del receptor en la línea celular seleccionada, mientras el segundo plásmido poseerá un promotor ligado al gen de la luciferasa en el que se inserta el elemento de respuesta al receptor particular. Si el compuesto que se va a someter a ensayo es un agonista del receptor, el ligando formará complejo con el receptor, y el complejo resultante se unirá al elemento de respuesta e

iniciará la transcripción del gen de la luciferasa. La quimioluminiscencia resultante se mide después fotométricamente, y se obtienen curvas dosis-respuesta y se comparan con las de ligandos conocidos. El protocolo anterior se describe en detalle en la patente de Estados Unidos N° 4.981.784 y la publicación internacional PCT N° WO 88/03168, para cuyo propósito se refiere el experto en la técnica.

5

[0164] En un caso adicional de esta divulgación, se pueden preparar kits de ensayo comerciales adecuados para su uso por un especialista médico para determinar la presencia o ausencia del receptor del factor de crecimiento anormal o el péptido de epítomos de receptor expuesto en células diana sospechosas. De acuerdo con las técnicas de ensayo que se han analizado anteriormente, una clase de dichos kits contendrá al menos el péptido de receptor
10 marcado o su compañero de unión, por ejemplo un anticuerpo específico para el mismo, e indicaciones, por supuesto, dependiendo del procedimiento seleccionado, por ejemplo, "competitivo", "sándwich", "DASP" y similares. Los kits también pueden contener reactivos periféricos tales como tampones, estabilizadores, etc.

[0165] Por consiguiente, se puede preparar un kit de ensayo para demostrar la presencia o capacidad de las
15 células para un receptor del factor de crecimiento anormal predeterminado, incluyendo EGFR, la actividad, que comprende:

(a) una cantidad predeterminada de al menos un componente reactivo marcado inmuoquímicamente obtenido mediante anclaje directo o indirecto del presente péptido de receptor o un compañero de unión específica para el
20 mismo, a un marcador detectable;

(b) otros reactivos; e

(c) instrucciones para el uso de dicho kit.

25

[0166] Más específicamente, el kit de ensayo diagnóstico puede comprender:

(a) una cantidad conocida del péptido de receptor como se ha descrito anteriormente (o un compañero de unión) generalmente unido a una fase sólida para formar un inmunoabsorbente, o como alternativa, unido a una etiqueta
30 adecuada, o varios de dichos productos finales, etc. (o sus compañeros de unión) entre sí;

(b) si fuera necesario, otros reactivos; e

(c) instrucciones para el uso de dicho kit de ensayo.

35

[0167] En una variación adicional, el kit de ensayo se puede preparar y usar para los fines establecidos anteriormente, que funciona de acuerdo con un protocolo predeterminado (por ejemplo, "competitivo", "sándwich", "doble anticuerpo", etc.), y comprende:

40 (a) un componente marcado que se ha obtenido acoplando el péptido de receptor a un marcador detectable;

(b) uno o más reactivos inmuoquímicos adicionales de los cuales al menos un reactivo es un ligando o un ligando inmovilizado, cuyo ligando se selecciona entre grupo que consiste en:

45 (i) un ligando capaz de unirse con el componente marcado (a);

(ii) un ligando capaz de unirse con un compañero de unión del componente marcado (a);

(iii) un ligando capaz de unirse con al menos uno de los componentes a determinar; y

50

(iv) un ligando capaz de unirse con al menos uno de los compañeros de unión de al menos uno de los componentes a determinar; e

(c) instrucciones para el funcionamiento de un protocolo para la detección y/o determinación de uno o más
55 componentes de una reacción inmuoquímica entre el péptido de receptor y un compañero de unión específico para el mismo.

[0168] De acuerdo con lo anterior, se puede preparar un sistema de ensayo para cribar fármacos potenciales eficaces para modular la actividad del péptido de receptor, o un anticuerpo para el mismo. El péptido de receptor o

anticuerpo puede introducirse en un sistema de ensayo, y el futuro fármaco también puede introducirse en el cultivo celular resultante, y después de esto, el cultivo se examina para observar cualquier cambio en la actividad del receptor del factor de crecimiento de las células, debido a la adición del futuro fármaco en solitario, o debido al efecto de las cantidades añadidas del péptido de receptor conocido, o un anticuerpo para el mismo.

5

Composiciones

[0169] La presente invención contempla adicionalmente composiciones terapéuticas útiles en la práctica de los procedimientos terapéuticos de esta invención. Una composición terapéutica sujeto incluye, mezclados, un
10 excipiente farmacéuticamente aceptable (portador) y uno o más de un péptido de receptor, particularmente seleccionado entre un péptido que consiste en una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-14, o un fragmento inmunogénico del mismo, como se describe en el presente documento como un principio activo.

[0170] La preparación de composiciones terapéuticas que contienen polipéptidos, análogos o fragmentos activos
15 como principios activos se conoce bien en la técnica. Típicamente, dichas composiciones se preparan en forma de inyectables, en forma de soluciones o suspensiones. No obstante, también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para la solución, o suspensión, en líquido antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse. El principio terapéutico activo se mezcla a menudo con excipientes que son farmacéuticamente
20 aceptables y compatibles con el principio activo. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores del pH que aumentan la eficacia del principio activo.

[0171] Se puede formular un polipéptido, análogo o fragmento activo en la composición terapéutica en formas
25 salinas farmacéuticamente aceptables neutralizadas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácidos (formadas con los tres grupos amino libres de la molécula de polipéptido o anticuerpo) y que se forman con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácidos clorhídricos o fosfóricos, o ácidos orgánicos, tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas a partir de grupos carboxilo libres también se pueden obtener de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio,
30 calcio, o férricos, y dichas bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino-etanol, histidina, procaína, y similares.

[0172] Las composiciones que contienen el polipéptido, análogo, o fragmento activo terapéutico pueden administrarse por vía oral, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa, mediante inyección o administración de una
35 dosis unitaria, por ejemplo. La expresión "dosis unitaria" cuando se usa en referencia a una composición terapéutica de la presente invención se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificación unitaria para seres humanos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado junto con el diluyente requerido; es decir, el portador, o vehículo. Las composiciones que contienen el péptido de receptor terapéutico o fragmento inmunogénico pueden administrarse de forma múltiple en
40 serie, como en un programa de vacunación.

[0173] Las composiciones se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad que se va a administrar depende del sujeto que se vaya a tratar, de la capacidad del sistema inmunitario del sujeto para utilizar el principio activo, y del grado de inhibición o neutralización
45 de la unión del receptor del factor de crecimiento y la capacidad de señalización deseada. Las cantidades exactas de principio activo requeridas a administrar dependen del criterio del médico y son peculiares para cada individuo. Sin embargo, las dosificaciones adecuadas pueden variar de aproximadamente 0,1 a 20, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10, y más preferiblemente de uno a varios, miligramos de principio activo por kilogramo de peso corporal del individuo por día y dependen de la ruta de administración. Los regímenes
50 adecuados para la administración inicial y las dosis de refuerzo también son variables, pero están tipificados por una administración inicial seguida de dosis repetidas a intervalos de una o más horas de una inyección u otra administración posterior. Como alternativa, se contempla la infusión intravenosa continua suficiente para mantener concentraciones de diez nanomolar a diez micromolar en sangre.

[0174] Las composiciones terapéuticas pueden incluir adicionalmente una cantidad eficaz del péptido de receptor, o anticuerpo del mismo, y uno o más de los siguientes principios activos: un anti-mitótico, un agente
55 quimioterapéutico, un inmunomodulador.

Ácidos Nucleicos

[0175] Otra característica de esta invención es la expresión de las secuencias de ADN que codifican los péptidos de receptor desvelados en el presente documento. Como se conoce bien en la técnica, las secuencias de ADN pueden expresarse conectándolas operativamente a una secuencia de control de la expresión en un vector de expresión apropiado y empleando este vector de expresión para transformar un huésped unicelular apropiado. Tal conexión operativa de una secuencia de ADN de esta invención a una secuencia de control de la expresión, por supuesto, incluye, si no forma parte ya de la secuencia de ADN, la provisión de un codón de iniciación, ATG, en el marco de lectura correcto en la dirección 5' de la secuencia de ADN.

[0176] Se puede emplear una amplia diversidad de combinaciones de huésped/vector de expresión al expresar las secuencias de ADN de esta invención. Los vectores de expresión útiles, por ejemplo, pueden consistir en segmentos cromosómicos, no cromosómicos y secuencias sintéticas de ADN. Los vectores adecuados incluyen derivados de SV40 y plásmidos bacterianos conocidos, por ejemplo, los plásmidos de *E. coli* col EI, pCR1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos, tales como RP4; ADN de fagos, por ejemplo, los numerosos derivados del fago λ , por ejemplo, NM989, y otro ADN de fagos, por ejemplo, ADN de M13 y de fagos de hebra sencilla filamentosos; plásmidos de levaduras tales el plásmido 2μ o sus derivados; vectores útiles en células eucariotas, tales como vectores útiles en células de insecto o mamífero; vectores obtenidos a partir de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos, tales como plásmidos que se han modificado para emplear ADN de fagos u otras secuencias de control de la expresión; y similares.

[0177] Se puede usar cualquiera de una amplia diversidad de secuencias de control de la expresión - secuencias que controlan la expresión de una secuencia de ADN conectada operativamente a ella - en estos vectores para expresar las secuencias de ADN de esta invención. Dichas secuencias de control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores temprano y tardío de SV40, CMV, vaccinia, polioma o adenovirus, el sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema *TAC*, el sistema *TRC*, el sistema *LTR*, las regiones operadora y promotora principales del fago λ , las regiones de control de la proteína de la envoltura fd, el promotor para la 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glicolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida (por ejemplo, Pho5), los promotores de los factores de emparejamiento α de levadura, y otras secuencias que se sabe que controlan la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus, y diversas combinaciones de los mismos.

[0178] También son útiles una amplia diversidad de células huésped unicelulares en la expresión de las secuencias de ADN de esta invención. Estos huéspedes pueden incluir huéspedes eucariotas y procariotas bien conocidos, tales como cepas de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, hongos, tales como levaduras, y células animales, tales como células CHO, R1.1, B-W y L-M, células de riñón de mono verde Africano (por ejemplo, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40 y BMT10), células de insecto (por ejemplo, Sf9), y células humanas y células vegetales en cultivo tisular.

[0179] Se entenderá que no todos los vectores, secuencias de control de la expresión y huéspedes funcionarán igualmente bien para expresar las secuencias de ADN de esta invención. No todos los huéspedes funcionarán igualmente bien con el mismo sistema de expresión. Sin embargo, un experto en la técnica será capaz de seleccionar los vectores, las secuencias de control de la expresión, y los huéspedes apropiados sin demasiada experimentación para completar la expresión deseada sin apartarse del alcance de esta invención. Por ejemplo, al seleccionar un vector, se debe considerar el huésped debido a que el vector debe funcionar en él. El número de copias del vector, la capacidad para controlar ese número de copias, y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tal como un marcador antibiótico, también se tendrá en consideración.

[0180] Al seleccionar una secuencia de control de la expresión, se tendrán en consideración normalmente una variedad de factores. Estos incluyen, por ejemplo, la fuerza relativa del sistema, su controlabilidad, y su compatibilidad con la secuencia de ADN o gen concreto que se van a expresar, particularmente en lo que se refiere a las estructuras secundarias potenciales. Los huéspedes unicelulares adecuados se seleccionarán considerando, por ejemplo, su compatibilidad con el vector elegido, sus características de secreción, su capacidad para plegar las proteínas correctamente, y sus requerimientos de fermentación, así como la toxicidad para el huésped del producto codificado por las secuencias de ADN que se van a expresar, y la facilidad de purificación de los productos de expresión.

[0181] Considerando estos y otros factores, un experto en la técnica será capaz de construir una variedad de combinaciones de vector/secuencia de control de la expresión/huésped que expresarán las secuencias de ADN de esta invención en la fermentación o en un cultivo animal a gran escala.

[0182] Adicionalmente se pretende que se puedan preparar análogos peptídicos a partir de las secuencias de nucleótidos del derivado del complejo/subunidad proteico dentro del alcance de la presente invención. Los análogos, tales como fragmentos, pueden producirse, por ejemplo, por digestión proteolítica, incluyendo digestión con pepsina, de los péptidos. Otros análogos, tales como las muteínas, pueden producirse mediante mutagénesis dirigida a sitio convencional de las secuencias que codifican el péptido de receptor. Los análogos que muestran "actividad del péptido de epítomos de receptor", tales como las moléculas pequeñas, funcionan como promotores o como inhibidores, pueden identificarse mediante ensayos *in vivo* y/o *in vitro* conocidos.

[0183] Como se ha mencionado anteriormente, se puede preparar una secuencia de ADN que codifica el péptido o péptidos de receptor sintéticamente en lugar de clonarlo. La secuencia de ADN puede diseñarse con los codones apropiados para la secuencia de aminoácidos del péptido de receptor. En general, se seleccionarán los codones preferidos para el huésped de interés si la secuencia se va a utilizar para la expresión. La secuencia completa se ensambla a partir de oligonucleótidos solapantes preparados mediante procedimientos convencionales y se ensambla en una secuencia codificante completa. Véase, por ejemplo, Edge, *Nature*, 292: 756 (1981); Nambair y col., *Science*, 223: 1299 (1984); Jay y col., *J. Biol. Chem.*, 259: 6311 (1984).

[0184] Las secuencias sintéticas de ADN permiten la construcción conveniente de genes que expresaran análogos del péptido de receptor o "muteínas". Como alternativa, se puede elaborar ADN que codifica muteínas mediante mutagénesis dirigida a sitio de genes o ADNc de genes del receptor del factor de crecimiento nativos o ADNc, y las muteínas se pueden elaborar directamente usando la síntesis de polipéptidos convencional.

[0185] Se describe un procedimiento general para la incorporación específica de sitio de aminoácidos no naturales en las proteínas por Christopher J. Noren, Spencer J. Anthony-Cahill, Michael C. Griffith, Peter G. Schultz, *Science*, 244: 182-188 (April 1989). Este procedimiento puede usarse para crear análogos con aminoácidos no naturales.

Antígenos y Vacunas

[0186] La caracterización de los antígenos tumorales reconocidos por los linfocitos T ha revolucionado el acercamiento de vacunas contra el cáncer, proporcionando por primera vez la oportunidad de inmunizar a los pacientes contra el cáncer mediante el uso de antígenos bien definidos. Ya que el melanoma es uno de los tumores inmunogénicos prototípicos, se han realizado una serie de ensayos clínicos de fase temprana en melanoma. Se han documentado algunas regresiones tumorales, principalmente para pacientes con enfermedad metastásica. Los avances recientes incluyen nuevas herramientas para el monitoreo de la respuesta inmune anti-cáncer y el desarrollo de adyuvantes encaminados a inducir una fuerte respuesta inmune anti-melanoma.

[0187] El cáncer de próstata es la segunda causa de muerte por cáncer en hombres en Estados Unidos. Las estrategias de vacunación representan un novedoso enfoque terapéutico. Una diana potencial para una vacuna contra el cáncer de próstata es antígeno prostático específico (PSA), debido a su expresión restringida en el cáncer de próstata y las células epiteliales prostáticas normales. Se han identificado varios epítomos específicos de PSA que pueden activar los linfocitos T citotóxicos (CTL) y a su vez conducen a la eliminación de las dianas tumorales por los CTL específicos de péptidos. Ahora se han empleado estrategias en los ensayos clínicos con vacunas de células dendríticas pulsadas por ARN, vacunas de proteínas recombinantes y administración de vectores virales recombinantes de las vacunas. También se están investigando nuevos enfoques que incorporan moléculas coestimuladoras que potencian la activación de linfocitos T.

[0188] Las células dendríticas (DC) son células potentes que presentan antígeno que tienen la capacidad de estimular respuestas inmune anti-tumorales de linfocitos T primarias en animales y seres humanos. Desde el primer ensayo clínico publicado de vacunación de células dendríticas en 1995, se han publicado 98 estudios que describen más de 1000 vacunas en revistas médicas especializadas o se han presentado en las reuniones anuales de la American Society for Clinical Oncology, la American Association of Cancer Research, o la American Society of Hematology. Los ensayos se han realizado en 15 países. Los ensayos incluyeron pacientes con más de 20 tipos de tumor; la mayor parte de los ensayos estudiaron pacientes con melanoma maligno, cáncer de próstata, carcinoma colorrectal o mieloma múltiple, usando DC autólogas pulsadas con antígenos sintéticos o anticuerpos idiotipo. Las vacunas de DC también se prepararon pulsando DC con lisados tumorales o ARN, por la transfección con ADN tumoral, o creando fusiones de células tumorales/DC. Se usaron diversos enfoques con respecto al número de células de vacuna, longitud del programa de vacunas, sitio de vacunación, conservación congelada de vacunas y el uso de una etapa de maduración para las DC. Los efectos adversos asociados con la vacunación de DC fueron poco frecuentes; la mayoría fueron leves y autolimitados y ninguno fue grave. Se observaron respuestas clínicas en aproximadamente la mitad de los ensayos. La vacunación con DC puede proporcionar un enfoque seguro con

respecto a la inmunoterapia del cáncer que puede superar el alcance limitado y la inmunogenicidad de vacunas peptídicas.

- [0189]** Después de estudios exitosos en ratones y monos, Gonzales y col. (Gonzales, G y col. (2003) *Annals Oncol* 14: 461-466) informaron de estudios humanos de vacunación con el ligando de EGFR, EGF, acoplado a una proteína portadora, la proteína recombinante de la membrana externa P64K de *Neisseria meningitides*, en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas en fase avanzada (NSCLC). Se observaron mejores tiempos de supervivencia en pacientes con una buena respuesta de los anticuerpos anti-EGF.
- [0190]** Los antígenos sintéticos, incluyendo vacunas, pueden prepararse sintetizando químicamente los péptidos de receptor de la presente invención, incluyendo opcionalmente otros antígenos tumorales. Estos péptidos, combinaciones portadoras de péptidos, derivados lipídicos de dichos péptidos, así como antígenos tumorales, pueden usarse de forma individual o combinados como un cóctel, y pueden formarse con un adyuvante para proporcionar una composición inmunogénica. Como se contempla en el presente documento, un antígeno puede unirse covalentemente a un análogo glucolipídico para proporcionar una molécula discreta que muestra un efecto auxiliar potenciado sobre el antígeno que es mayor que el efecto auxiliar que puede obtenerse en ausencia de dicho enlace covalente. Estas composiciones pueden usarse para inmunizar mamíferos, por ejemplo, por las vías intramuscular o parenteral, o mediante la administración a las superficies de la mucosa usando micropartículas, cápsulas, liposomas y moléculas de direccionamiento, tales como toxinas y anticuerpos.
- [0191]** Generalmente, se conocen bien en la técnica vacunas que contienen péptidos, como se ilustra por las patentes de Estados Unidos N° 4.601.903; 4.599.231; 4.599.230; y 4.596.792.
- [0192]** El uso de péptidos *in vivo* puede requerir en primer lugar su modificación química puesto que los péptidos pueden no tener un suero suficientemente extenso y/o una semivida tisular y/o una inmunogenicidad suficiente. Además, puede ser ventajoso modificar los péptidos para imponer una restricción conformacional sobre ellos. Esto puede ser útil, por ejemplo, para imitar una conformación de origen natural del péptido en el contexto de la proteína nativa para optimizar las respuestas inmunes efectoras que se provocan.
- [0193]** Esta invención proporciona una composición inmunogénica que comprende una cantidad del péptido de receptor seleccionada entre las SEQ ID NO: 1-10.
- [0194]** Esta divulgación proporciona un procedimiento de estimulación o potenciación de una respuesta inmune mediada por células específicas de antígeno que comprende administrar a un sujeto una cantidad de un péptido de receptor, o un fragmento inmunogénico del mismo, y un adyuvante adecuado.
- [0195]** Esta divulgación proporciona un procedimiento de tratamiento de un sujeto con un tumor o un cáncer que comprende administrar a un sujeto una cantidad del péptido de receptor y una composición adyuvante de la presente invención como un inmunomodulador, y un portador o diluyente adecuado. En particular, un sujeto que tiene cáncer puede tratarse con la composición adyuvante del péptido de receptor. Dichos cánceres incluyen, pero sin limitación, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de laringe, carcinoma de células escamosas o tumores de próstata y glioma.
- [0196]** Adicionalmente, el sujeto puede tratarse con el péptido de receptor o la composición inmunogénica del mismo junto con terapia quimioterapéutica, quimiopreventiva o de radiación. Se contempla por esta divulgación que puede usarse la composición del péptido de receptor junto con intervención quimio o radioterapéutica. En otra realización, el tratamiento con la composición del péptido de receptor puede preceder o seguir al tratamiento del agente de daño al ADN en intervalos que varían de minutos a semanas. Se conocen protocolos y procedimientos por los expertos en la técnica. Se conocen agentes o factores de daño al ADN por los expertos en la técnica y se refieren a cualquier compuesto químico o procedimiento de tratamiento que induce daño al ADN al aplicarse a una célula. Dichos agentes y factores incluyen radiación y ondas que inducen daño al ADN, tales como irradiación gamma, rayos X, irradiación UV, microondas, emisiones electrónicas, y similares. Una diversidad de compuestos químicos, también descritos como "agentes quimioterapéuticos", tienen la función de inducir daño al ADN, cada uno de los cuales pretende usarse en los procedimientos de tratamiento combinado desvelados en el presente documento. Los agentes quimioterapéuticos contemplados para usarse, incluyen, por ejemplo, adriamicina, 5-fluorouracilo (5FU), etopósido (VP-16), camptotecina, actinomicina-D, mitomicina C, cisplatino (CDDP) e incluso peróxido de hidrógeno. Pueden usarse combinaciones de uno o más agentes de daño al ADN con EHA, ya sean compuestos basados en radiación o actuales, tales como el uso de rayos X con cisplatino o el uso de cisplatino con etopósido. Otros agentes neoplásicos o tóxicos incluyen, pero sin limitación: 5-fluorouracilo, metotrexato y

adriamicina que pueden unirse en cada caso a, por ejemplo, una cefalosporina (véanse los documentos WO-A94 01 137 y EP-A-0 382 411) o mostazas de cefalosporina (véase el documento EP-A-O 484 870).

[0197] Las composiciones del péptido de receptor o inmunogénicas pueden prepararse como inyectables, en forma de soluciones líquidas o emulsiones. Los antígenos y las composiciones inmunogénicas pueden mezclarse con portadores fisiológicamente aceptables que son compatibles con los mismos. Pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. La vacuna puede contener adicionalmente sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH, para potenciar adicionalmente su eficacia. Las vacunas pueden administrarse por inyección por vía subcutánea o intramuscular.

[0198] Como alternativa, las composiciones inmunogénicas formadas de acuerdo con la presente invención, pueden formularse y administrarse de manera que provoquen una respuesta inmune en superficies mucosas.

[0199] Por lo tanto, la composición inmunogénica puede administrarse a superficies mucosas, por ejemplo, por vía nasa u oral (intragástrica). Como alternativa, pueden ser deseables otros modos de administración, incluyendo supositorios. Para los supositorios, los aglutinantes y portadores pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles y triglicéridos. Las formulaciones orales pueden incluir excipientes empleados normalmente, tales como productos de calidad farmacéutica de sacarina, celulosa y carbonato de magnesio.

[0200] Los modos de administración pueden comprender el uso de cualquier medio y/o procedimiento adecuado para administrar el adyuvante o la vacuna que contiene el adyuvante a un locus corpóreo del animal huésped donde el adyuvante y los antígenos asociados son eficaces de manera inmunoestimulante. Los modos de administración pueden incluir, sin limitación, procedimientos de administración parenteral, tales como por vía paracanceral, transmucosa, transdérmica, intramuscular, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular, intracraneal e intratumoral.

[0201] La invención se entenderá mejora por referencia a los siguientes Ejemplos no limitantes, que se proporcionan como ejemplares de la invención. Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar más completamente las realizaciones preferidas de la invención y, sin embargo, no deben interpretarse como limitantes del amplio alcance de la invención.

EJEMPLO 1

[0202] El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se sobreexpresa en muchos cánceres epiteliales, una observación a menudo correlacionada con un peor pronóstico clínico. La sobreexpresión del EGFR está causada comúnmente por la amplificación del gen EGFR y se asocia a veces con la expresión de una variante EGFR (EGFR de2-7 o EGFRvIII) que lleva una delección interna en su dominio extracelular. MAb 806 es un anticuerpo EGFR novedoso con una actividad antitumoral significativa que reconoce tanto el EGFR de2-7 como un subconjunto del EGFR de tipo salvaje (wt) cuando se sobreexpresan, pero no se une al EGFR wt expresado en los tejidos normales. A pesar de unirse únicamente a una baja proporción del EGFR wt expresado en las células tumorales A431 (~10%), mAb 806 muestra una fuerte actividad anti-tumoral frente a xenoinjertos A431 desarrollados en ratones sin pelo. Para dilucidar el mecanismo que conduce a su especificidad única y modo de actividad anti-tumoral, se ha determinado el epítipo de unión a EGFR de mAb 806. El análisis de la unión de mAb 806 a fragmentos de EGFR expresados sobre la superficie de la levadura, o en un formato de inmunotransferencia, identificó un bucle estabilizado por puentes disulfuro (aminoácidos 287-302) que parecía contener el epítipo mAb 806. De hecho, mAb 806 se unió con una aparente alta afinidad (~30 nM) a un péptido EGFR sintético correspondiente a estos aminoácidos. El análisis de la estructura del EGFR indica que este bucle estabilizado por puentes disulfuro está únicamente disponible para la unión de mAb 806 en una forma transitoria del receptor que tiene lugar, ya que el EGFR cambia de la conformación amarrada inactiva a una conformación activa unida a ligando. Parece que mAb 806 se une esta pequeña proporción de receptores transitorios evitando su activación, lo que a su vez genera un fuerte efecto antitumoral. Finalmente, nuestras observaciones sugieren que la generación de anticuerpos con respecto a formas de transición de receptores del factor de crecimiento puede representar una forma novedosa de reducir el direccionamiento del tejido normal aún conservando actividad antitumoral.

INTRODUCCIÓN

[0203] El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es una tirosina cinasa unida a membrana de 170 kDa que es responsable de dirigir la proliferación y diferenciación de muchos tipos de células diferentes (1,2). La

sobreexpresión del EGFR se ha observado en muchos tumores epiteliales, con un aumento de los niveles de expresión del EGFR generalmente en correlación con un peor pronóstico clínico (3-5). La sobreexpresión del receptor a menudo está causada por la amplificación del gen *EGFR*, un evento también vinculado a la mutación de EGFR (6). La mutación de *EGFR* más común es un truncamiento extracelular del EGFR conocido como el EGFR de2-7 (o EGFRvIII), que se expresa con frecuencia en glioma (6-8). Este truncamiento da como resultado la eliminación de 267 aminoácidos del dominio extracelular del EGFR y la inserción de una glicina novedosa, que genera un péptido de empalme único cerca del N-terminal del EGFR de2-7 (6-8). Aunque el EGFR de2-7 es incapaz de unirse a ningún ligando conocido, muestra bajos niveles de activación constitutiva y mejora la tumorigenicidad de las células de glioma y de mama cuando crecen como xenoinjertos en ratones sin pelo (9-11).

10

[0204] La inhibición del EGFR es una estrategia racional para el desarrollo de nuevos productos terapéuticos contra el cáncer (12). Los productos terapéuticos potenciales incluyen anticuerpos anti-EGFR (13) e inhibidores de tirosina cinasa de bajo peso molecular (14) del EGFR. En la actualidad se han ensayado en la clínica varios anticuerpos dirigidos al dominio extracelular del EGFR incluyendo EMD 55900 (15), ABX-EGF (16) y C225 (Cetuximab) (17), cada uno de los cuales ha mostrado alguna actividad anti-tumoral en los pacientes. El más avanzado clínicamente de estos es C225, que se está ensayando actualmente en ensayos clínicos en Fase II/III para el tratamiento de carcinomas de cabeza y cuello, colorrectal y de pulmón de células no pequeñas y se ha aprobado recientemente para su uso en Europa (18). Se ha constatado que la actividad anti-tumoral de estos anticuerpos está relacionada principalmente con su capacidad de bloquear la unión de ligando pero también podrían tener una función otros mecanismos antitumorales, tales como la función efectora inmune, regulación a la baja del receptor, inducción de una señalización e interferencia inapropiadas con la dimerización y/o oligomerización del receptor. Una limitación de los anticuerpos que se dirigen al EGFR de tipo salvaje (wt) es que muestran una captación significativa en tejido normal, tal como el hígado y la piel (19,20). En el presente, el direccionamiento del EGFR normal parece causar efectos secundarios manejables, tales como erupción cutánea, sin embargo, si estos anticuerpos anti-EGFR se acoplaron a agentes citotóxicos o radioisótopos se esperará un daño hepático significativo.

[0205] El mAb 806 se originó frente a las células de fibroblastos de ratón que expresaban el EGFR de2-7 y no se une a un tejido normal que expresa el EGFR wt, haciéndolo un candidato atractivo para la terapia contra el cáncer (21). A diferencia de otros anticuerpos específicos de EGFR de2-7, que son todos específicos al péptido de empalme de EGFR de2-7 único (24-26), mAb 806 reconoce un epítipo diferente y desconocido (27). De hecho, mAb 806 puede unirse fuertemente al EGFR wt tras la desnaturalización del EGFR por inmunotransferencia o incluso cubrición sobre la superficie de las placas ELISA. Mientras que mAb 806 reconoce una gran fracción del EGFR de2-7, también se une a algunos de los EGFR wt en células que sobreexpresan el receptor (27). El análisis de Scatchard ha revelado que mAb 806 se une a ~50 % del EGFR de2-7 reconocido por mAb DH8.3, un anticuerpo específico para el péptido de empalme de EGFR de2-7 (27). Por el contrario, mAb 806 se unió a <10 % del EGFR wt sobreexpresado en las células A431 en comparación con el mAb 528 específico de EGFR wt. De manera importante, mAb 806 no se une a un tejido normal que expresa el EGFR wt. De forma interesante, mAb 806 también reconoce preferiblemente la forma con alto contenido de manosa del EGFR situado normalmente en el retículo endoplasmático. Cuando se usó como un único agente, mAb 806 demostró una actividad anti-tumoral significativa contra xenoinjertos humanos que expresaban el EGFR de2-7 o amplificado. La determinación del epítipo de unión a mAb 806 será importante para entender su mecanismo de acción, así como proporcionar una estrategia general para desarrollar anticuerpos específicos de tumor. Usando dos enfoques independientes ahora se identifica el epítipo reconocido por mAb 806. Aprovechando la estructura de cristal descrita recientemente para EGFR, también se puede explicar la especificidad única de mAb 806 y cómo media su actividad anti-tumoral.

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Anticuerpos

50

[0206] El anticuerpo monoclonal 806 IgG2b y mAb528 IgG2a específico para el EGFR se produjeron y se purificaron en la Biological Production Facility (Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne) como se ha descrito previamente (27,28).

55 Vectores de expresión

[0207] Los vectores de expresión pEE14/sEGFR501 y pEE14/sEGFR513 se han descrito previamente (29) y codifican el péptido señal y los primeros 501 y 513 aminoácidos, respectivamente, del ectodominio de EGFR seguido de una etiqueta de epítipo *c-myc*, todos transcritos bajo el control del promotor temprano inmediato del

citomegalovirus humano. El vector de expresión pEE14/sEGFR310-501 contiene ADNc que codifica el péptido señal del EGFR fusionado en el mismo marco de lectura a los restos aminoacídicos 310-501 del ectodominio, terminando con la etiqueta del epítipo.

- 5 **[0208]** Se generaron por PCR una serie de fragmentos del ectodominio marcado con *c-myc* del EGFR solapantes, partiendo en los restos 274, 282, 290 y 298 y todos terminando en el aminoácido 501. Tras el análisis de secuencia, los fragmentos se clonaron en el mismo marco de lectura en el extremo 3' del gen de la hormona de crecimiento humano (GH) expresado a partir del vector de expresión mamífero, pSGHVO (30). Se clonaron en el mismo marco de lectura oligonucleótidos de doble cadena que abarcaban los restos 278-286 y 285-293 en el mismo vector entre
10 GH y la etiqueta *c-myc*.

Transfecciones

- 15 **[0209]** Los fibroblastos de riñón embrionarios 293T humanos se mantuvieron en Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) más suero fetal de ternera al 10 % (FCS). El día antes de la transfección, las células se sembraron en una cantidad de 8×10^5 por pocillo en placas de cultivo tisular de 6 pocillos que contenían 2 ml de medio. Las células se transfectaron con 3-4 μ g de ADN plasmídico complejado con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. De veinticuatro a 48 horas después de la transfección, los cultivos celulares se aspiraron y las monocapas celulares se lisaron en 250 μ l de tampón de lisis (Triton X-100 al 1%, glicerol al 10%,
20 NaCl 150 mM, HEPES 50 mM pH 7,4, EGTA 1 mM y mezcla de Inhibidor de Proteasas Completo (Roche).

[0210] La delección del bucle de CR1 (grupo de dimerización) se generó eliminando los aminoácidos 244-259 y reemplazándolos por un único resto de alanina como se describe. Las células 293T se transfectaron con este patrón y se seleccionaron transfectantes estables en presencia de geneticina.

25

Transferencia de Western

- [0211]** Las alícuotas del lisado celular (10-15 μ l) se mezclaron con tampón de muestra SDS que contenía β -mercaptoetanol al 1,5%, se desnaturalizaron por calentamiento durante 5 minutos a 100 °C y se sometieron a
30 electroforesis en geles de poliacrilamida NuPAGE Bis-Tris al 10% (Invitrogen). Después, las muestras se electro-transferieron a membranas de nitrocelulosa que se aclararon en tampón TBST (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 100 mM y Tween-20 al 0,1%) y se bloquearon en TBST que contenía leche desnatada al 2,5% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron durante una noche a 4 °C con 0,5 μ g/ml de mAb 806 en tampón de bloqueo. Se sondearon membranas paralelas durante una noche con mAb 9B11 (1:5000, Cell Signalling
35 Technology) para detectar el epítipo *c-myc*. Los filtros se lavaron en TBST y se incubaron en tampón de bloqueo que contenía inmunoglobulina de conejo dirigida contra ratón conjugada con peroxidasa de rábano rusticano (Biorad) en una dilución 1:5000 durante 2 horas a temperatura ambiente. Después, las transferencias se lavaron en TBST y se desarrollaron usando una película autoradiográfica tras la incubación con sustrato quimioluminiscente Western Pico (Pierce). Para experimentos de competición peptídica, las transferencias se sondearon durante 1 hora
40 a temperatura ambiente con Mab 806 en presencia de un exceso molar de 100 veces de péptido competitivo. Tras la detección quimioluminiscente, las transferencias se sondearon de nuevo con 9B11.

Presentación de superficie en levadura de fragmentos de EGFR

- 45 **[0212]** Los plásmidos de presentación en levadura pCT, modificados para contener los genes apropiados que codifiquen los fragmentos de EGFR, se transformaron en la cepa de levadura EBY100 (32) por electroporación (33) usando un aparato de transfección pulsador de genes Bio-Rad (Richmond, CA). El plásmido contiene un marcador *trp⁺* que puede usarse para seleccionar la levadura que tiene incorporada el ADN en su genoma. La expresión de proteínas de EGFR en la superficie celular de la levadura se realizó como se ha descrito previamente (Boder y
50 Wittrup, 2000). En resumen, las colonias transformadas se desarrollaron a 30 °C en un medio mínimo que contenía base de nitrógeno para levaduras, ácidos casamino, dextrosa y tampón fosfato a pH 7,4, en una plataforma de agitación durante aproximadamente un día hasta que se alcanzó un OD₆₀₀ de 5-6. Después, las células de levadura se indujeron para la presentación de proteínas por transferencia a un medio mínimo que contenía galactosa, y se incubaron con agitación a 30 °C durante 24 h. Después, los cultivos se almacenaron a 4 °C hasta su análisis.

55

Experimentos de etiquetado de anticuerpos sobre la superficie celular de las levaduras

[0213] Se obtuvo un fluido de ascitos sin procesar que contenía el anticuerpo monoclonal *c-myc* 9E10 a partir de Covance (Richmond, CA). Se lavaron 1×10^6 células de levadura con tampón FACS (PBS que contenía 1 mg/ml de

BSA) y se incubaron con ascitos anti-c-myc (dilución 1:50), o anticuerpo monoclonal EGFR humano (10 µg/ml) en un volumen final de 50 µl, durante 1 h a 4 °C. Después, las células se lavaron con tampón FACS enfriado con hielo y se incubaron con IgG anti-ratón marcado con ficoeritrina (dilución 1:25), en un volumen final de 50 µl durante 1 h a 4 °C, protegidas de la luz. Después de lavar las células de levadura con tampón FACS enfriado con hielo, se obtuvieron los datos de fluorescencia con un citómetro de flujo Coulter Epics XL (Beckman-Coulter), y se analizaron con el software de citometría WinMDI (J. Trotter, Scripps University). Para la determinación de epítomos lineales frente a conformacionales, las células de levadura se calentaron a 80 °C durante 30 min, y después se enfriaron en hielo 20 min antes del etiquetado con anticuerpos.

10 Péptidos derivados de EGFR

[0214] Los péptidos (²⁸⁷CGADSYEMEEDGVRK₃₀₂ (SEQ ID NO: 1), ²⁸⁷CGADSYEMEEDGVRK₃₀₁ (SEQ ID NO: 2) y ²⁸⁷CGADSYEMEEDG₂₉₈ (SEQ ID NO: 15)) que contenían el epítipo mAb 806 putativo se sintetizaron usando química Fmoc convencional y análisis espectrales de masas verificados. El péptido ciclado se preparó mediante la oxidación aérea durante una noche de una solución peptídica diluida en condiciones alcalinas. El péptido lineal (reducido) se preparó disolviendo el péptido sintetizado en HCl acuoso 10 mM. Una muestra del péptido 287-302 se hizo reaccionar con bromuro de cianógeno en fórmico al 70% en condiciones anaerobias para generar fragmentos correspondientes a los péptidos N y C-terminales. Los péptidos se separaron por HPLC en una columna C18 Vydac usando un gradiente de acetonitrilo en presencia de ácido trifluoroacético al 0,1% (TFA). La autenticidad de los péptidos se caracterizó posteriormente por espectrometría de masas y secuenciación N-terminal. Se produjo una muestra del péptido S-carboximetilado (péptido SCM) haciendo reaccionar el péptido con ditiotritol en bicarbonato sódico 0,5 M a pH 8,6 seguido de la adición de yodoacetamida. El péptido SCM se purificó posteriormente por RP-HPLC como se ha descrito anteriormente.

25 Ensayo ELISA

[0215] Los pocillos de las placas de 96 pocillos de poliestireno blancas (Greiner Lumitrac 600) se recubrieron con 2 µg/ml de 501-Fc, una forma variante de sEGFR501 fusionada a la región constante Fc humana (T. Adams, resultados no publicados), en citrato sódico 10 mM a pH 5,9 y después se bloquearon con ovalbúmina de pollo al 0,5% en TBS. Después del lavado con TBST, las soluciones (100 µl/pocillo) de 0,5 µg/ml de mAb806 y concentraciones variables de péptidos se añadieron a los pocillos. Se detectó mAb 806 unido a placa usando inmunoglobulina de cabra anti-ratón-HRP (BioRad) y sustrato quimioluminiscente Western Pico (Pierce) y se cuantificó usando un contador Wallac Victor 1420 (Perkin Elmer). En algunos ensayos, se recubrieron placas de 96 pocillos con el EGFR 1-501 y se usaron para analizar la unión a mAb 806 como se ha descrito previamente (Johns y col. Intl. J. Cancer 98: 398-408, 2002).

Resonancia de Plasmón Superficial (BIAcore)

[0216] Se usó un aparato BIAcore 3000 para todos los experimentos. Los péptidos que contenían el epítipo mAb 806 putativo se inmovilizaron en un chip sensor CM5 usando acoplamiento de intercambio de amina o tiol-disulfuro a un caudal de 5 µl/min (34). El anticuerpo 806 se pasó por la superficie del sensor a un caudal de 5 µl/min a 25 °C. Las superficies se generaron entre realizaciones inyectando HCl 10 mM a un caudal de 10 µl/min.

Análisis de Citometría de Flujo

[0217] Se analizaron 293 células cultivadas que expresaban diferentes patrones de EGFR para obtener la expresión de EGFR usando mAb 528 y 806. Se incubaron 1×10^6 células con 5 µg/ml de anticuerpo primario, en PBS que contenía HSA al 1% durante 30 min a 4 °C. Después del lavado con PBS/HSA al 1%, las células se incubaron 30 min más con anticuerpo de cabra dirigido contra ratón acoplado a FITCa 4 °C (dilución 1:100; Calbiochem, San Diego, CA). Después, las células se analizaron en un Epics Elite ESP (Beckman Coulter, Hialeah, FL) observando un mínimo de 5.000 eventos y se analizaron usando EXPO (versión 2) para Windows.

RESULTADOS

55 Identificación del epítipo mAb 806 por inmunotransferencia de fragmentos de EGFR

[0218] Para determinar la amplia ubicación del epítipo mAb 806, los fragmentos de EGFR marcados con c-myc 1-513 y 310-501 se separaron por SDS-PAGE y se sometieron a inmunotransferencia con mAb 806. Mientras que

mAb 806 mostró una fuerte reactividad con el fragmento 1-513, no se unió en absoluto al segmento 310-501 del EGFR (figura 1, panel izquierdo). El fragmento 310-501 estuvo presente en la membrana ya que pudo detectarse usando mAb 9B11 que es específico para la etiqueta c-myc (figura 1, panel derecho). En otros experimentos, se estableció que mAb 806 también se unió al fragmento sEGFR501 en transferencias de western (datos no mostrados). Dado que mAb 806 se une al EGFR de2-7 (27), que tiene los aminoácidos 6-273 eliminados, se concluyó que el epítipo mAb 806 debe contenerse en los restos 274-310 o 501-513. Para delinear el epítipo mAb 806 se expresó una serie de fragmentos de EGFR marcados con c-myc, terminando cada uno en el aminoácido 501. El mAb 806 se hizo reaccionar tanto con los fragmentos de EGFR 274-501 como 282-501, pero fracasó al unirse a los segmentos que comenzaban en el aminoácido 290 o 298 (figura 1, panel izquierdo). La presencia de todos los patrones de EGFR se confirmó usando el anticuerpo c-myc (figura 1, panel derecho). Por lo tanto, el epítipo mAb 806 debe incluirse en los aminoácidos 282-310. Además, mientras que el epítipo puede extenderse más allá del aminoácido 290, la región 282-290 debe contener algunos de los restos aminoacídicos críticos para la reactividad de mAb 806 en este ensayo de inmunotransferencia particular.

15 Identificación del epítipo mAb 806 por presentación de los fragmentos de EGFR sobre la superficie de la levadura

[0219] Se usó un segundo enfoque independiente para determinar el epítipo mAb 806. Se expresaron fragmentos que incluían diferentes dominios del EGFR sobre la superficie de la levadura y se ensayaron para determinar la unión de mAb 806 por FACS. El mAb 806 reconoció tanto los fragmentos 1-621 como 1-501 expresados sobre la superficie de la levadura (Figura 2A). El mAb 806 también se une al fragmento de EGFR 273-621 que corresponde al dominio extracelular del EGFR de2-7 (Figura 2A). Por el contrario, mAb 806 no puede reconocer los fragmentos 294-543 o 475-621 de EGFR (Figura 2A), demostrando claramente que al menos alguno del epítipo mAb 806 debe incluirse en la región entre los aminoácidos 274-294 (véanse los aminoácidos 282-290 que se han identificado anteriormente). Dado que estos dos enfoques dispares identificaron la misma región que crítica para la unión de mAb 806, era seguro que esta sección del EGFR debe contener una porción energéticamente importante del epítipo mAb 806. De forma interesante, la desnaturalización térmica a 80 °C del epítipo 1-501 no tuvo ningún efecto sobre la unión de mAb 806, lo que sugería que el epítipo es lineal en lugar de conformacional (Figura 2B). Este resultado es completamente coherente con los datos que muestran que mAb 806 se convierte en un anticuerpo de "pan" una vez que el receptor se desnaturaliza por SDS-PAGE (27).

30

Unión de mAb 806 a un péptido de EGFR que contiene el epítipo putativo

[0220] Se sintetizó un péptido (287CGADSYEMEEEDGVRKC₃₀₂) correspondiente a un bucle de cisteína conteniendo probablemente el epítipo mAb 806 putativo. Este péptido fue capaz de inhibir la unión de mAb 806 a los fragmentos 1-501 y 274-501 de EGFR en una inmunotransferencia. (Figura 3A, paneles superiores). La presencia de fragmentos de EGFR en ambas porciones de la inmunotransferencia se confirmó por separación y re-sondeo con anti-myc (Figura 3A, panel inferior). El péptido 287-302 de EGFR en solución también fue capaz de inhibir la unión de mAb 806 a fragmento 1-501 usando un formato ELISA (Figura 3B). De forma interesante, un péptido más corto (aminoácidos 287-298) no inhibió la unión de mAb 806 a las concentraciones ensayadas (Figura 3B). Por lo tanto, parece ser que el epítipo mAb 806 se incluye en los restos 287-302, que forman un bucle restringido a disulfuro en el EGFR.

[0221] También se ensayó la capacidad del péptido 287-302 de EGFR de inhibir la unión de mAb 806 a 501-Fc inmovilizado, una versión dimérica del fragmento 1-501 de EGFR fusionado a la región Fc de IgG1 humana. El péptido oxidado, reducido y madurado (es decir, agregado moderadamente) inhibió por completo la unión de mAb 806 a 501-Fc de una manera dependiente de la dosis (Figura 4A). Un péptido que contenía restos de cisteína reducida y S-carboximetilada fue incapaz de inhibir la unión de mAb 806 que indicaba que uno o ambos restos de cisteína contribuyen al epítipo mAb 806 (Figura 4B). Los fragmentos peptídicos N-terminal (CGADSYEM) (SEQ ID NO: 16) o C-terminal (EEGVRKC) (SEQ ID NO: 17) generados por escisión de bromuro de cianógeno fueron incapaces de inhibir la unión de mAb 806 (Figura 4B), lo que implicaba que el epítipo extiende el intervalo del resto de metionina. Este dato proporciona confirmación adicional de que el epítipo mAb 806 se incluye en el péptido derivado del EGFR 287-302.

[0222] El péptido 287-302 de EGFR se acopló a un chip sensor CM5 mediante acoplamiento de intercambio de tiol-disulfuro en un resto de cisteína terminal y la unión de mAb 806 se analizó por resonancia de plasmón superficial (BIAcore). El mAb 806 se unió al péptido inmovilizado de una manera dependiente de la dosis (Figura 5A) con una afinidad aparente de 30 nM (Figura 5A), que es coherente con la afinidad obtenida usando el análisis Scatchard sobre células vivas (27). La unión de mAb 806 a un canal en blanco, un canal de bloqueo de cisteína o un péptido irrelevante fueron inferiores al 1% de la unión al péptido 287-302 de EGFR (datos no mostrados). Puesto que la

afinidad de mAb 806 para este péptido es similar a la afinidad mostrada para EGFR de2-7, parece que el péptido contiene todos los determinantes importantes que contribuyen al epítipo. Ya que el péptido se inmovilizó usando acoplamiento de tiol y, por lo tanto, no pudo formar un enlace disulfuro intramolecular, esta observación demuestra adicionalmente que el bucle no ha de ciclarse para la unión de mAb 806. También se inmovilizó el péptido 287-302 de EGFR a través de acoplamiento amina y se mostró que el mAb 806 aún estaba unido (Figura 5B).

[0223] Después, se ensayó la capacidad de varios péptidos de EGFR en solución para bloquear la unión de mAb 806 a un péptido 287-302 de EGFR inmovilizado. Como se esperaba, el péptido 287-302 de EGFR soluble inhibió la unión de mAb 806 de una manera dependiente de la dosis (Figura 5B, panel superior). En consonancia con los datos ELISA (Figura 3B), el péptido 287-298 de EGFR fue incapaz de impedir la unión de mAb 806 incluso cuando se usó en un gran exceso (Figura 5B, panel central). Un péptido adicional, que carecía simplemente de C302 (es decir, los aminoácidos 287-301) fue capaz de inhibir débilmente la unión de mAb 806 de una manera dependiente de la dosis (Figura 5B, panel inferior). Estas observaciones confirmaron que se requiere el resto aminoacídico C302 para la unión de mAb 806 de alta afinidad.

Análisis estructural del epítipo mAb 806 y su relación con respecto a la activación de EGFR

[0224] Varios estudios cristalográficos recientes han descrito la estructura del dominio extracelular de EGFR. Por lo tanto, se analizó el epítipo mAb 806 en cuanto a su ubicación estructural para determinar si este podía explicar su especificidad única. El bucle de cisteína que contenía el epítipo mAb 806 (Figura 6A) se localiza en la porción C-terminal del dominio CR1 rico en cisteína (Figura 6B, magenta). De forma interesante, esta región del EGFR es una de las deficientemente caracterizadas en la estructura, lo que sugiere un grado de flexibilidad relativamente. Una porción considerable del bucle de EGFR 287-302 se sepulta dentro del EGFR, sin embargo, dos regiones se exponen más y son potencialmente accesibles por el anticuerpo. La primera de estas se centra en D290 (Figura 6C, resaltado en magenta en la vista del lado izquierdo) y la segunda de estas se centra en D297, que puede observarse cuando la molécula gira 180° (Figura 6C, resaltado en magenta en la vista del lado derecho).

[0225] La forma amarrada del EGFR representado en la Figura 6C es una conformación inactiva del receptor. En este estado, el dominio CR2 de EGFR interactúa con el dominio CR1 de manera que impide que el brazo de dimerización un pequeño bucle contenido en el dominio CR1, interactúe con el brazo de dimerización de las otras moléculas de EGFR. La liberación del EGFR conduce a una forma extendida del receptor en la que el brazo de dimerización se expone (Figura 6D, panel izquierdo) permitiendo que se produzca la dimerización del receptor (Figura 6B). El entendimiento actual sugiere que cuando en equilibrio sobre el 95% de la superficie celular del EGFR está en conformación amarrada (37). El EGFR restante estará en el dímero activo o en conformación no amarrada extendida. La adición del ligando impulsará más del receptor hasta la forma dimérica (Figura 6B).

[0226] Con respecto a posibles sitios de unión de mAb 806, los únicos restos accesibles en la forma amarrada del receptor son los centrados en D297. Sin embargo, dado que el mAb 806 únicamente se une al 5-10% de EGFR en líneas celulares que sobre-expresan el receptor, es extremadamente improbable que mAb 806 se una a la forma amarrada de EGFR, que forma el 95% del EGFR sobre la superficie celular. En base a la información estructural presentada en la Figura 6, la dimerización del EGFR no expone ningún resto aminoacídico adicional en el epítipo mAb 806 y, por lo tanto, no será una diana para la unión de mAb 806. Dado el tamaño de un anticuerpo, ninguno de los aminoácidos expuestos centrados en D290 será accesible para el mAb 806 en la conformación amarrada o dimérica. Puesto que el EGFR se desplaza de la conformación amarrada al estado dimérico activo, debe pasar a través de un estado extendido transitorio. Esta forma transitoria del EGFR (Figura 6D) puede ser monomérica, o posiblemente un dímero inactivo, y será comparativamente raro sobre la superficie celular en consonancia con el nivel de la unión de mAb m806. Significativamente, en esta forma transitoria del receptor, los restos alrededor de D290, así como varios aminoácidos normalmente sepultados (por ejemplo, Y292 y M294) serán accesibles para la unión del anticuerpo. Las consideraciones espaciales indicarán en gran medida que la unión de mAb 806 a la región cercana a D290 requerirá una interacción con los aminoácidos fuera del bucle de cisteína, una posibilidad inconsistente con los datos de afinidad que sugiere que todo el epítipo mAb 806 está dentro del bucle de cisteína. Si se elimina D290 como una región de unión, entonces mAb 806 debe interactuar con la región alrededor de Y292/M294, aunque el epítipo puede extenderse adicionalmente para incluir D297. Tomados juntos, la única conclusión coherente es que mAb 806 se une a aminoácidos únicamente expuestos en la forma extendida del EGFR antes de que se someta a dimerización.

Unión de mAb 806 a formas constitutivamente libres del EGFR

[0227] Para confirmar que mAb 806 se une preferiblemente al EGFR no dimerizado/libre, se expresó de forma

estable una mutación del EGFR que carece del brazo de dimerización de CR1 (bucle de CR1) en 293 células (31). Esta región se seleccionó debido a su función en la formación de dímeros de EGFR activos y porque el brazo de dimerización de CR1 está también implicado de forma íntegra en las interacciones CR1:CR2 asociadas con el amarre. Por lo tanto, el deCR1, como el EGFR de2-7, debe liberarse constitutivamente. Las 293 células parentales expresan un bajo nivel de EGFR de tipo salvaje (aproximadamente 1×10^4 EGFR/células) como es evidente por la unión de mAb 528 por FACS (Figura 7). Como se esperaba, mAb 806 no se une al EGFR endógeno expresado en estas líneas celulares. El de2-7 EGFR, como el bucle deCR1, no debe ser capaz de amarrarse y debe tener una dimerización reducida. La transfección de 293 células con el EGFR de2-7 condujo a una fuerte unión de mAb 806 como se ha mostrado previamente en otras líneas celulares (Figura 7). La unión del mAb 528 dependiente altamente conformacional al EGFR de bucle de CR1 confirma que no hay ningún cambio bruto con respecto a su conformación (Figura 7). De hecho, se ha mostrado previamente que el EGFR del bucle de CR1 puede unirse a ligando soportando adicionalmente la noción que mantiene intacta su estructura general (31). Los análisis de citometría de flujo de dos clones de expresión de EGFR del bucle de CR1 independientes, mostraron claramente la unión de mAb 806 (Figura 7). Por lo tanto, en consonancia con las hipótesis, mAb 806 parece unirse al EGFR libre transitorio antes de que este forme un dímero activo. MAb 806 también muestra una unión aumentada a mutantes puntuales de EGFR que tienen una capacidad reducida de amarre (véase el EJEMPLO 2 que se indica a continuación).

ANÁLISIS

[0228] El mAb 806 se generó tras la inmunización con fibroblastos de ratón que expresaban el de2-7 EGFR y se seleccionó por ensayo de hemadsorción mixta para la alta reactividad a de2-7 EGFR y la actividad despreciable contra el EGFR de tipo salvaje (21). Una caracterización adicional pronto reveló que mAb 806 reconocerá las líneas celulares y especímenes de glioma cuando se sobreexpresó el EGFR de tipo salvaje, especialmente cuando se amplificó el gen *EGFR*, pero no tejido normal (21). Recientemente, se demostró que mAb 806 se une preferiblemente a la forma de alto contenido en manosa de tanto el EGFR de2-7 como de tipo salvaje situado en el retículo endoplasmático. Además, se demostró que algún EGFR wt de alto contenido en manosa está mal dirigido a la superficie celular cuando las células sobreexpresan el receptor. Sin embargo, este trabajo no identificó el epítipo mAb 806 ni explicó adecuadamente la fuerte actividad anti-tumoral mediada por mAb 806. Usando dos metodologías independientes, se identificó un bucle de cisteína (aminoácidos 287-302) que contiene el epítipo mAb 806. Puesto que la afinidad de mAb 806 a un péptido sintético que incluye los restos 287-302 es similar a la que se ha medido previamente por análisis Scatchard con líneas celulares que expresan de2-7 EGFR (27), se confía en que contiene la secuencia epitópica completa. Evidentemente, el péptido no tiene que estar restringido en un bucle estabilizado por puentes disulfuro para la unión de anticuerpos, ya que mAb 806 reconoció un péptido reducido en solución, un péptido inmovilizado por tiorol y se unió débilmente a un péptido soluble con C302 eliminado.

[0229] Tanto la inmunoprecipitación como el análisis Scatchard demostraron que mAb 806 reconoce entre el 5-10% del EGFR de tipo salvaje expresado en la superficie de las células A431 (27), una línea celular que sobreexpresa el receptor debido a una amplificación del gen *EGFR*. A pesar de la unión a una baja proporción de receptores, mAb 806 presente una fuerte actividad anti-tumoral contra xenoinjertos A431 desarrollados en ratones sin pelo (22, 23). La observación de que mAb 806 se une preferiblemente al EGFR libre sugiere un mecanismo probable para esta actividad anti-tumoral. Según una molécula de EGFR se libera, entra en un estado transitorio entre dímero amarrado inactivo y activo (37). Es esta forma libre transitoria del EGFR la que se acopla por mAb 806. La unión de mAb 806 impide entonces la formación de dímeros de EGFR aptos para señalización (Figura 8). Por lo tanto, mientras que mAb 806 únicamente se une a un bajo porcentaje del EGFR en cualquier momento dado, durante un periodo de tiempo extendido será capaz de inhibir una proporción sustancial de señalización de EGFR que, a su vez, genera un efecto anti-tumoral *in vivo*. El destino del EGFR unido a mAb 806 no se conoce, aunque se ha mostrado previamente que el complejo mAb 806/de2-7 EGFR se internaliza (27). Como alternativa, el mAb806/EGFR puede permanecer atrapado sobre la superficie en una forma inactiva, como es el caso tras el tratamiento de las células con inhibidores de tirosina cinasa de bajo peso molecular específicos para el EGFR (28, 38). A diferencia del EGFR de tipo salvaje, el mAb 806 reconoce aproximadamente la mitad de las moléculas de de2-7 EGFR expresadas sobre la superficie celular en comparación con DH8.3 (27), un anticuerpo específico para el receptor mutante. El aumento de la reactividad de mAb 806 para el de2-7 EGFR está en consonancia con el hecho de que este receptor mutante carece del bucle de dimerización de CR1 y, por lo tanto, no puede asumir la conformación amarrada.

[0230] Si mAb 806 reconoce una conformación transitoria normal, pero poco abundante en comparación, del EGFR, ¿por qué no se une a tejidos normales o líneas celulares que expresen niveles "medios" de EGFR? Esta observación no parece estar relacionada con la sensibilidad de detección, ya que en un estudio previo se demostró que el mAb 806 yodado no se unió a un gránulo celular de glioma U87MG (1×10^5 EGFR/célula) que contenía $1 \times$

10⁷ células, cuyo gránulo celular A431 más pequeño debe haber sido lo suficientemente sensible para medir la unión de bajo nivel. Se ha determinado que la glucosilación influye en la reactividad de mAb 806 y que mAb 806 reconoce preferiblemente la forma rica en manosa del EGFR que reside normalmente en el retículo endoplasmático. Además, en las células que sobreexpresan el EGFR, parte de este receptor rico en manosa está mal dirigido a la superficie celular.

[0231] Incluso aunque la homología de secuencia del epítipo mAb 806 sea relativamente baja en ErbB3/B4, el tamaño y ubicación del bucle de cisteína se conserva. Además, hay dos restos aminoacídicos completamente conservados (E293 y G298) y dos adicionales donde se conserva la carga (E295 y R300). Finalmente, la estructura general de ErbB3 (y probablemente ErbB4), es muy similar a la del EGFR en que adopta una conformación amarrada que presumiblemente se libera durante la activación (41). En su conjunto, esto sugiere que los anticuerpos dirigidos al bucle de cisteína equivalente en ErbB3/B4 tienen propiedades similares a mAb 806 (es decir, especificidad restringida a tumores y la capacidad de bloquear la activación del receptor). Más ampliamente, los datos sugieren que la generación de los anticuerpos con respecto a formas transitorias de receptores del factor de crecimiento representa una manera novedosa de reducción del direccionamiento del tejido normal que aún conserva actividad anti-señalización. Por consiguiente, las comparaciones entre la estructura de receptores activos (unidos a ligando) y sus contrapartes inactivas deben identificar aminoácidos expuestos de forma transitoria durante los cambios conformacionales del receptor. Finalmente, se generó mAb 806 mediante la inmunización con células que expresan una mutación activa constitutivamente del EGFR y seleccionando anticuerpos específicos para este receptor mutado. Por lo tanto, la inmunización con un receptor constitutivamente activo puede proporcionar una estrategia generalizada que aumenta la probabilidad de identificar anticuerpos que reconozcan formas transitorias del receptor.

REFERENCIAS

- [0232]**
1. Wells, A. (1999) *Int J Biochem Cell Biol* 31, 637-643
2. Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A., and Hynes, N. E. (2000) *Embo J* 19, 3159-3167
3. Mendelsohn, J. (2002) *J Clin Oncol* 20, 1S-13S.
4. Arteaga, C. L. (2002) *Semin Oncol* 29, 3-9.
5. Nicholson, R. I., Gee, J. M., and Harper, M. E. (2001) *Eur J Cancer* 37 Suppl 4, S9-15.
6. Frederick, L., Wang, X. Y., Eley, G., and James, C. D. (2000) *Cancer Res* 60, 1383-1387.
7. Wong, A. J., Ruppert, J. M., Bigner, S. H., Grzeschilc, C. H., Humphrey, P. A., Bigner, D. S., and Vogelstein, B. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 2965-2969.
8. Sugawa, N., Ekstrand, A. J., James, C. D., and Collins, V. P. (1990) *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8602-8606.
9. Wilstrand, C. J., Reist, C. J., Archer, G. E., Zalutsky, M. R., and Bigner, D. D. (1998) *J Neurovirol* 4, 148-158.
10. Tang, C. K., Gong, X. Q., Moscatello, D. K., Wong, A. J., and Lippman, M. E. (2000) *Cancer Res* 60, 3081-3087.
11. Nishikawa, R., Ji, X. D., Harmon, R. C., Lazar, C. S., Gill, G. N., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7727-7731.
12. de Bono, J. S., and Rowinsky, E. K. (2002) *Trends Mol Med* 8, S 19-26.
13. Herbst, R. S., and Shin, D. M. (2002) *Cancer* 94, 1593-1611
14. Wakeling, A. E. (2002) *Curr Opin Pharmacol* 2, 382-387.
15. Stragliotto, G., Vega, F., Stasiecki, P., Gropp, P., Poisson, M., and Delattre, J. Y. (1996) *Eur J Cancer* 32A, 636-640.

16. Lynch, D. H., and Yang, X. D. (2002) *Semin Oncol* 29, 47-50.
17. Herbst, R. S., Kim, E. S., and Harari, P. M. (2001) *Expert Opin Biol Ther* 1, 719-732.
- 5 18. Herbst, R. S., and Langer, C. J. (2002) *Semin Oncol* 29, 27-36.
19. Divgi, C. R., Welt, S., Kris, M., Real, F. X., Yeh, S. D., Gralla, R., Merchant, B., Schweighart, S., Unger, M., Larson, S. M., and et al. (1991) *J Natl Cancer Inst* 83, 97-104.
- 10 20. Busam, K. J., Capodieci, P., Motzer, R., Kiehn, T., Phelan, D., and Halpern, A. C. (2001) *Br J Dermatol* 144, 1169-1176.
21. Jungbluth, A. A., Stockert, E., Huang, H. J., Collins, V. P., Coplan, K., Iversen, K., Kolb, D., Johns, T. J., Scott, A. M., Gullick, W. J., Ritter, G., Cohen, L., Scanlan, M. J., Cavanee, W. K., and Old, L. J. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 639-644.
- 15 22. Luwor, R. B., Johns, T. G., Murone, C., Huang, H. J., Cavanee, W. K., Ritter, G., Old, L. J., Burgess, A. W., and Scott, A. M. (2001) *Cancer Res* 61, 5355-5361.
- 20 23. Mishima, K., Johns, T. G., Luwor, R. B., Scott, A. M., Stockert, E., Jungbluth, A. A., Ji, X. D., Suvarna, P., Voland, J. R., Old, L. J., Huang, H. J., and Cavanee, W. K. (2001) *Cancer Res* 61, 5349-5354.
24. Hills, D., Rowlinson-Busza, G., and Gullick, W. J. (1995) *Int. J Cancer* 63, 537-543.
- 25 25. Humphrey, P. A., Wong, A. J., Vogelstein, B., Zalutsky, M. R., Fuller, G. N., Archer, G. E., Friedman, H. S., Kwatra, M. M., Bigner, S. H., and Bigner, D. D. (1990) *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4207-4211.
26. Wikstrand, C. J., Hale, L. P., Batra, S. K., Hill, M. L., Humphrey, P. A., Kurpad, S. N., McLendon, R. E., Moscatello, D., Pegram, C. N., Reist, C. J., and et al. (1995) *Cancer Res* 55, 3140-3148.
- 30 27. Johns, T. G., Stockert, E., Ritter, G., Jungbluth, A. A., Huang, H. J., Cavanee, W. K., Smyth, F. E., Hall, C. M., Watson, N., Nice, E. C., Gullick, W. J., Old, L. J., Burgess, A. W., and Scott, A. M. (2002) *Int. J Cancer* 98, 398-408.
- 35 28. Johns, T. G., Luwor, R. B., Murone, C., Walker, F., Weinstock, J., Vitali, A. A., Perera, R. M., Jungbluth, A. A., Stockert, E., Old, L. J., Nice, E. C., Burgess, A. W., and Scott, A. M. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15871-15876.
29. Elleman, T. C., Domagala, T., McKern, N. M., Nerrie, M., Lonqvist, B., Adams, T. E., Lewis, J., Lovrecz, G. O., Hoyne, P. A., Richards, K. M., Howlett, G. J., Rothacker, J., Jorissen, R. N., Lou, M., Garrett, T. P., Burgess, A. W., Nice, E. C., and Ward, C. W. (2001) *Biochemistry* 40, 8930-8939.
- 40 30. Leahy, D. J., Dann, C. E., 3rd, Longo, P., Perman, B., and Ramyar, K. X. (2000) *Protein Expr Purif* 20, 500-506.
31. Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Zhu, H. J., Walker, F., Frenkel, M. J., Hoyne, P. A., Jorissen, R. N., Nice, E. C., Burgess, A. W., and Ward, C. W. (2002) *Cell* 110, 763-773.
32. Boder, E. T., and Wittrup, K. D. (1997) *Nat Biotechnol* 15, 553-557.
- 50 33. Meilhac, E., Masson, J. M., and Teissie, J. (1990) *Biotechnology (NY)* 8, 223-227.
34. Nice, E. C., and Catimel, B. (1999) *Bioessays* 21, 339-352.
35. Ferguson, K. M., Berger, M. B., Mendrola, J. M., Cho, H. S., Leahy, D. J., and Lemmon, M. A. (2003) *Mol Cell* 11, 507-517.
- 55 36. Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fulcai, S., Yamanaka, M., Kim, J. H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2002) *Cell* 110, 775-787.

37. Burgess, A. W., Cho, H. S., Eigenbrot, C., Ferguson, K. M., Garrett, T. P., Leahy, D. J., Lemmon, M. A., Sliwkowski, M. X., Ward, C. W., and Yokoyama, S. (2003) *Mol Cell* 12, 541-552

38. Arteaga, C. L., Ramsey, T. T., Shawver, L. K., and Guyer, C. A. (1997) *J Biol Chem* 272, 23247-23254.

39. Decker, S. J. (1984) *Mol Cell Biol* 4, 571-575

40. Zhen, Y., Caprioli, R. M., and Staros, J. V. (2003) *Biochemistry* 42, 5478-5492

41. Cho, H. S., and Leahy, D. J. (2002) *Science* 297, 1330-1333

EJEMPLO 2

ANÁLISIS DE INTERACCIONES DEL DOMINIO CR1/CR2 EN LA FUNCIÓN DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO DE SUPERFICIE CELULAR

[0233] Los datos cristalográficos recientes sobre el dominio extracelular aislado del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) han sugerido un modelo para su activación por ligando. Se ha ensayado este modelo en el contexto de EGFR de longitud completa presente en la superficie celular, mediante la introducción de mutaciones en dos regiones (CR1 y CR2) del dominio extracelular pensado para ser crítico para la regulación de la activación del receptor. Las mutaciones en los dominios CR1 y CR2 tienen efectos opuestos sobre la afinidad de unión de ligando, la dimerización de receptor, la activación de tirosina cinasa y la competencia de señalización. Tyr²⁴⁶ es un resto importante en el bucle de CR1, que está implicado en el posicionamiento y estabilización de la interfaz del dímero del receptor después de la unión de ligando: las mutaciones de Tyr²⁴⁶ alteran o suprimen la función del receptor. Las mutaciones en CR2, que debilitan la interacción que restringe el receptor al estado amarrado, mejoran la capacidad de respuesta a EGF aumentando la afinidad para el ligando. Sin embargo, el debilitamiento de la interacción de CR1/CR2 no da como resultado una activación espontánea de la cinasa de los receptores. Se ha usado un anticuerpo (mAb806), que reconoce un estado de transición del receptor de EGF entre el estado amarrado negativamente limitado y la conformación de dímero contiguo completamente activa, para seguir los cambios conformacionales en los receptores de EGF de tipo salvaje y mutante después de la unión de ligando. Los resultados sugieren que el EGFR sobre la superficie celular puede estar libre, pero esta forma es inactiva; por lo tanto, la liberación del receptor no es suficiente para la activación, y la unión de ligando es esencial para el correcto posicionamiento de las dos subunidades de receptor para conseguir la activación de la cinasa.

INTRODUCCIÓN

[0234] Durante los últimos veinte años, el receptor de EGF ha proporcionado importantes oportunidades para el estudio de la activación de tirosina cinasas intracelulares asociadas a receptor (1-3). Recientemente, se han divulgado las tres estructuras tridimensionales de los dominios extracelulares (ECD) para varios miembros de la familia del receptor de EGF (EGFR, ErbB-2 y ErbB-3) (4-9). Estas estructuras revelaron dos conformaciones significativamente diferentes para el ECD del receptor de EGF (4;5;9). En la estructura cristalina del ECD truncado y soluble del EGFR complejo con TGF- α (4) o con EGF (5) el ligando se intercala entre los dominios L1 y L2 (de unión a ligando), los ECD forman dímeros contiguos, principalmente a través de los dos dominios interbloqueados CR1 (ricos en cisteína); por el contrario, en la estructura cristalina del EGFR autoinhibido en el complejo con EGF, el ligando se une únicamente al dominio L1, no hay ningún dímero presente y la interacción intramolecular principal del receptor monomérico se produce entre el dominio del bucle de CR1 y CR2 (9). En esta estructura, no solo la distancia entre L1 y L2 es demasiado grande para permitir la unión simultánea a una molécula de EGF, sino que L2 también se aleja del EGF unido a L1. Por lo tanto, dos características críticas distinguen la forma autoinhibida (amarrada) de la forma no amarrada del ECD del receptor EGF: la ausencia de dímeros y la incapacidad de unirse a ligando con alta afinidad. De forma interesante, la confirmación del ECD de ErbB-2 truncado (8) y de longitud completa (7) se asemeja al dímero de EGFR contiguo (4) mientras que el ECD de ErbB-3 en ausencia de ligando (6) tiene la misma conformación que el ECD de EGFR amarrado (9).

[0235] El trabajo con el EGFR celular de longitud completa ha establecido un fuerte vínculo entre la dimerización de EGFR, unión de alta afinidad y activación del receptor cinasa; mientras que las estructuras de cristal de los ECD aislados proporcionan un marcado mejorado para el entendimiento de estas observaciones (es decir, el ligando se unirá con mayor afinidad a la forma "no amarrada" del receptor, desviando de este modo el equilibrio del receptor monomérico autoinhibido y favoreciendo la formación de dímeros activos (9)), en el entorno celular los dominios cinasa y transmembrana del EGFR también contribuyen a la dimerización. De hecho, los dímeros de la superficie

celular (u oligómeros) pueden detectarse en ausencia de ligando, aunque los dímeros no ligados no tienen actividad tirosina cinasa (10-16). Por lo tanto, en el receptor de EGF de la superficie celular de longitud completa, la unión a ligando se requiere no solo para impulsar la dimerización, sino para la formación de la conformación activa de cinasa.

[0236] Las propiedades de la estructura y la unión a ligando de los fragmentos o incluso los EDC del receptor de EGF de longitud completa no pueden desentrañar la complejidad de la señalización de receptores presentes en la superficie celular. En este informe, con el fin de mejorar nuestra comprensión de las interacciones de CR1-CR2 en los procesos que determinan la unión de ligando, cambios conformacionales del receptor, la oligomerización del receptor y la regulación de la actividad de la cinasa, se han expresado mutantes del receptor de EGF de longitud completa expresados en células de mamífero intactas (BaF/3) (17;18). Las células BaF/3 no expresan receptores EGF endógenos, ni niveles detectables de ligandos que puedan perturbar y/o activar receptores recombinantes (mutantes). La disponibilidad de los mutantes de EGFR del bucle de CR1 y CR2 y de los anticuerpos específicos de conformación mAb528 (19) y mAb806 (20-23) han permitido demostrar los determinantes de amarre y detectar una mayor transición conformacional cuando el ligando se une al receptor.

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Reactivos

[0237] Los anticuerpos para el EGFR mAb528 (19) y mAb806 (20; 21) se produjeron y se purificaron en la instalación GMP en el Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne. El anticuerpo anti-flag M2 se adquirió en Sigma-Aldrich, los anticuerpos anti-fosfotirosina (clon 4G10) y anti-EGFR (policlonal de oveja) en Upstate (Lake Placid, NY); los anticuerpos anti-phospho-p44/p42 MAPK y los anticuerpos anti-MAPK se adquirieron en Cell Signaling (Beverly, MA). Las Ig de conejo anti-ratón acoplada a HRP y la Ig de conejo anti-oveja acoplada a HRP se obtuvieron en BioRad (Hercules, CA) y Dako (Fort Collins, CO) respectivamente. La inmunoglobulina anti-ratón marcada con alexa 488 se adquirió en Molecular Probes, Eugene, OR. El óxido de fenilarsina (PAO) se adquirió en Sigma-Aldrich. Los reactivos de entrecruzamiento solubles en agua y homobifuncionales BS³ (longitud del brazo separador: 11,4 Å) y Sulpho-EGS (longitud del brazo separador: 16,1 Å) se obtuvieron en Pierce (Rockford, IL).

Generación de patrones de mutantes de EGFR

[0238] Las mutaciones de punto único del EGFR de tipo salvaje se generaron usando un kit de mutagénesis dirigida a sitio (Stratagene, La Jolla, CA). La plantilla para cada mutagénesis era el ADNc de EGFR humano; (24)) que contenía la secuencia líder seguida de una secuencia de codificación de etiqueta FLAG, en el vector de expresión mamífero pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA) como se describe en (4). La secuenciación nucleotídica automatizada de cada patrón se realizó para confirmar la integridad de cada mutación del receptor de EGF. Los patrones de expresión de EGFR se expresaron de forma transitoria en 293 células (Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA) y la presencia de la proteína del receptor determinada por tinción con anticuerpos 528 y M2 para confirmar la expresión en la superficie celular y para asegurar el plegamiento proteico producido apropiadamente (datos no mostrados).

Transfección de patrones de EGFR y generación de líneas celulares estables.

[0239] Los patrones de EGFR de tipo salvaje y mutantes se transfectaron en la línea celular hemopoyética murina dependiente de IL-3 BaF/3 como se ha descrito previamente (25). Las células transfectadas se seleccionaron en G418 durante 10 días. Las células viables se cribaron para la expresión de EGFR por análisis FACS en un FACStar (Beckton and Dickinson, Franklin Lakes, NJ) usando anticuerpos para la etiqueta flag (M2 = 10 µg/ml en PBS/FCS al 5%/EDTA 5 mM) y/o el dominio extracelular de EGFR (mAb528: 10 µg/ml en PBS/FCS al 5%/EDTA 5 mM) seguido de Ig anti-ratón marcado con Alexa 488 (dilución final de 1:400). La fluorescencia de fondo se determinó incubando las células con un anticuerpo primario irrelevante de clase equivalente. Las agrupaciones positivas se clasificaron según el nivel apropiado de expresión de EGFR en FACS-DIVA (Becton and Dickinson). Después de la selección final, el ARNm se aisló de cada línea celular y todas las mutaciones en el EGFR se confirmaron mediante análisis por PCR. Todas las células se pasaron de forma rutinaria en medio condicionado por RPMI/FCS al 10%/WEHI3B al 10% (26) y 1,5 mg/ml de G418.

Unión de ligando

[0240] El EGF murino, purificado a partir de glándulas submaxilares de ratón (27), se sometió a yodación usando

Iodogen (28) con respecto a una actividad específica de $5-8 \times 10^5$ cpm/pmol. La unión de ligando a células que expresan el EGFR wt o mutante se determinó a temperatura ambiente en presencia del inhibidor de internalización óxido de fenilarsina (PAO) (29) mediante experimentos de saturación en frío. En resumen, las células se incubaron en PBS/BSA al 1%/PAO 30 μ M con o sin cantidades en aumento de EGF no marcado (20 pM-5,12 nM) y con una cantidad constante (300 pM) de 125 I-EGF. La unión no específica se determinó usando un exceso de 500 veces de EGF no marcado sobre 125 I-EGF. Todos los puntos experimentales se prepararon por triplicado. Al final de la incubación, las células se granularon y se lavaron dos veces en PBS enfriado con frío antes de transferirse a tubos nuevos para el recuento en un contador γ Wallac WIZARD (PerkinElmer, Boston, MA). Las transferencias de Scatchard y las estimaciones de las afinidades de unión de ligando y el número de receptores se obtuvieron usando el programa Radlig (BioSoft, Cambridge, Reino Unido).

Entrecruzamiento de receptor, fosforilación de tirosina y activación MAPK

[0241] Las células BaF/3 que expresan el EGFR wt o mutado se incubaron en medio sin IL-3 y FCS durante 3 h. Las células se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces en PBS y se incubaron en PBS a temperatura ambiente con o sin EGF (100 ng/ml) durante 10 minutos. En experimentos de limitación cruzada, las células se incubaron con BS³ 1,3 mM o Sulpho-EGS (Pierce Biotechnologies, Rockford, IL) durante 20 min a TA después de un tratamiento con PBS o EGF. Las células se lisaron en tampón de muestra SDS/PAGE con o sin agente reductor (β -mercaptoetanol 100 mM). Los lisados celulares totales se analizaron directamente por SDS-PAGE en geles de gradiente Tris al 3-8%/Acetato o Bis al 4-12%/Tris (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se transfirieron a membranas de PVDF antes de la inmunodetección con anticuerpos anti-fosfotirosina (4G10, UBI, dilución final de 1:1000), anticuerpos anti-EGFR (anti-EGFR de oveja, UBI, dilución final de 1:1000) o anticuerpos anti-phospho-MAPK (dilución final de 1:1000) seguido de Ig anti-ratón, anti-oveja o anti-conejo acoplado a HRP respectivamente (todos a una dilución final de 1:3000). Las bandas reactivas se visualizaron con reactivo ECL (Amersham). Para determinar la fosforilación de tirosina específica del EGFR, las membranas se sondeadas con anticuerpos anti-fosfotirosina se separaron con una solución de glicina 0,1 M (pH 2,1) y se sondearon de nuevo con anticuerpos anti-EGFR o anti-fosfo MAPK. Las películas se exploraron en un densitómetro de exploración Molecular Dynamics (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) y la cuantificación de bandas se realizó en ImageQuant usando integración del pico de línea amplia.

Respuestas mitogénicas a EGF

[0242] Las células que crecieron en fase logarítmica se cosecharon y se lavaron tres veces para eliminar IL-3 residual. Las células se suspendieron de nuevo en RPMI 1640 + FCS al 10%, se sembraron en placas de 96 pocillos usando el Biomek 2000 (Beckman) en 2×10^4 células por 200 μ l y se incubaron durante 4 horas a 37 °C en CO₂ al 10%. El EGF se añadió en el primer punto de valoración y se tituló por duplicado como diluciones por duplicado en la placa de 96 pocillos. Los pocillos de control recibieron el medio condicionado WEHI-3B a una concentración final del 5% (v/v). Se añadió ³H-timidina (0,5 μ Ci/pocillos) y las placas se incubaron durante 20 horas a 37 °C en CO₂ al 5%, antes se cosechase sobre esterillas de filtro de nitrocelulosa usando un cosechador automático (Tomtec, Connecticut, Estados Unidos). Las esterillas se secaron en un microondas, se pusieron en una bolsa de recuento de plástico y se añadió escintilador (10 ml). La ³H-timidina incorporada se determinó usando un contador beta (1205 Betaplate, Wallac, Finlandia).

Reactividad con anticuerpos específicos de conformación

[0243] Las células se incubaron previamente con anticuerpos, EGF o medio de control antes de la tinción de anticuerpos y el análisis FACS. La preincubación con anticuerpos (mAb528, mAb806 o un anticuerpo irrelevante de clase equivalente, todos a 10 μ g/ml) se realizó a 37 °C en RPMI/FCS al 10% durante tiempos que variaron de 30 min a 16 h. La preincubación con EGF (100 ng/ml en tampón FACS enfriado con hielo) se realizó sobre hielo durante 20 min. Después de la preincubación, las células se recogieron por centrifugación y se tiñeron con los anticuerpos de control o de ensayo (todos a 10 μ g/ml en tampón FACS durante 20 min sobre hielo, lavados en tampón FACS) seguida de Ig anti-ratón de Alexa 488 (dilución final de 1:400, 20 min sobre hielo) para detectar el anticuerpo primario. Las células se lavaron con tampón FACS enfriado con hielo, se recogieron por centrifugación y se analizaron en un FACScan; el canal de fluorescencia pico y la fluorescencia media se determinaron para cada muestra usando la herramienta Statistical en CellQuest (Becton and Dickinson). La fluorescencia de fondo (control negativo) se dedujo a partir de todas las mediciones. Los valores de fluorescencia media se escogieron como máximo representante de la forma pico y la intensidad de fluorescencia, y se usaron para obtener la relación de la unión de mAb806 con respecto a mAb528.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

[0244] El objetivo de este trabajo es determinar el papel de las interacciones del bucle de CR1/CR2 en las preferencias conformacionales, el mecanismo de activación y la señalización potencial del EGFR expresado en la superficie celular de longitud completa. Se han introducido mutaciones puntuales en los dominios CR1 y CR2 que se espera que perturben las interacciones de CR1/CR1 y/o CR1/CR2 y, en consecuencia, alteren el equilibrio entre los estados amarrado, no amarrado, inactivo y/o activo del EGFR. Estos patrones se han expresado en BaF/3, una línea celular hemopoyética que está desprovista de miembros de la familia de ErbB endógeno. Se han analizado los efectos de las mutaciones en la función del EGFR mediante la determinación de la cinética de unión, la dimerización, la fosforilación y señalización de la tirosina dependiente de ligando, y la capacidad de inducir la síntesis de ADN de manera dependiente de EGF. Sin embargo, estos parámetros son mediciones indirectas de la oligomerización del receptor, los cambios de configuración o conformacionales; por lo tanto, también se ha usado la unión de dos anticuerpos anti-EGFR conformacionalmente específicos, mAb528 (19) y mAb806 (20; 23; 30), como una herramienta para evaluar el efecto de las mutaciones en la conformación "de reposo" del EGFR y en la dinámica de los cambios conformacionales inducidos por ligando y cambios configuracionales.

Expresión del receptor y caracterización preliminar:

[0245] Se han analizado en detalle seis mutaciones puntuales (véase la figura 9A, 9B): tres mutaciones CR1 en Tyr²⁴⁶ (Phe, Trp y Asp) y tres sustituciones CR2 en Asp⁵⁶³ (para His), Glu⁵⁷⁸ (para Cys) y Val⁵⁸³ (para Asp). En un intento de vincular disulfuro con la interacción de CR1/CR2, se preparó un mutante con una sustitución en cada uno de CR1 y CR2 (Leu²⁴⁵ para Cys y Glu⁵⁷⁸ para Cys). Los EGFR recombinantes se expresaron en la línea celular hemopoyética BaF/3, que es ideal para la caracterización bioquímica del EGFR (18; 25). Después de la transfección y la selección en G418, la expresión del receptor se controló usando el anticuerpo anti-flag M2, así como el anticuerpo monoclonal 528, que se dirige al dominio extracelular del EGFR, bloquea la unión de ligando (19) y se informa para reconocer únicamente la forma nativa del receptor. En base a la reactividad con estos anticuerpos, todos los receptores mutantes parecen plegarse correctamente y se expresan en la superficie celular. Después de múltiples rondas de clasificación FACS se obtuvieron líneas celulares que expresaban niveles similares (20-40.000 R/célula) del EGFR mutante o wt (figura 10). Es esencial que la expresión del receptor esté por debajo de 100.000 receptores/célula: Los experimentos de expresión transitoria normalmente producen elevados niveles de EGFR de superficie celular (>10⁵/célula), sin embargo, a estos niveles de expresión a menudo hay una activación espontánea (es decir, fosforilación de tirosina independiente de ligando) del EGFR. Las razones para la activación no están claras, pero puede deberse a la oligomerización, un procesamiento incorrecto o iris plegado del receptor; se ha intentado evitar esta complicación mediante la producción de líneas celulares que expresan <50.000 R/célula.

Unión de ligando mediante mutantes de EGFR:

[0246] De las estructuras cristalinas del ECD amarrado (9) y no amarrado (4;5) del EGFR, se ha postulado que la afinidad del ligando para los dos formas será muy diferente. En la conformación no amarrada, el ligando puede entrar en contacto tanto con el dominio L1 como L2, mientras que en la conformación amarrada el ligando únicamente puede unirse a los dominios L1 o L2. Ferguson y col. (9) han notificado que el debilitamiento de la interacción entre los bucles de CR1 y CR2 aumenta la afinidad aparente del ECD de EGFR para EGF; sin embargo, el vínculo entre el amarrado del bucle de CR1 y el dominio CR2 y la afinidad de unión del ligando se basa en los datos obtenidos por el análisis BIAcore del ECD de EGFR aislado (9; 31). Los datos de unión cinética para el EGFR de longitud completa en la superficie celular producen constantes de afinidad que son al menos dos órdenes de magnitud menores, 20 pM-2 nM en comparación con 20-350 nM para el ECD de EGFR. La cinética de unión del EGFR a sus ligandos en un contexto celular se complica por factores independientes de la estructura, tal como la densidad del receptor local, el estado de oligomerización e interacciones con elementos citosólicos o citoesqueléticos (32-34). En el contexto del receptor de longitud completa, las modificaciones en los dominios de la cinasa, transmembrana y/o C-terminal también influyen en la afinidad del EGFR para sus ligandos (35-39). Por lo tanto, es importante medir los efectos de las mutaciones CR1 y CR2 sobre la afinidad de unión de ligando, el estado de la oligomerización y la señalización (véase más adelante) del receptor en las células intactas. Para evitar la internalización mientras se evalúa la unión de ligando a una temperatura fisiológica, las determinaciones de afinidad se realizaron en presencia de óxido de fenilarsina 30 μ M (29): en estas condiciones de ensayo, la internalización del EGFR se redujo a >1% (datos no mostrados). Los resultados de los análisis Scatchard de unión de EGF a EGFR wt y mutante se presentan en la TABLA 3 y la figura 11 y se resumen a continuación.

TABLA 3

Análisis Scatchard de unión de ^{125}I -EGF a células BaF/3 que expresan los receptores de EGF wt o mutantes					
Línea celular	K_d1 (pM)	% de sitios	K_d2 (nM)	% de sitios	R/célula $\times 10^{-4}$ (a)
EGFR wt	29+/- 9	2,6+/-0,4	1,6+/-0,6 0,49	97,5 +/-	3,4+/- 0,7
Mutantes del bucle de CR1:					
Y ²⁴⁶ F	----	----	2,8+/-0,9	(100)	3,0+/-0,2
Y ²⁴⁶ W	----	----	2,5+/-0,05	(100)	2,9+/-0,2
Y ²⁴⁶ D	----	----	2,1+/-0,3	(100)	1,2+/-0,1
Mutantes del bucle de CR2:					
V ⁵⁸³ D	2,6+/-1,3	12,6+/-4	1,3+/-0,3	90,8 +/- 1,9	3,8+/-0,71
D ⁵⁶³ H	17,6+/-4,4	4,4+/-0,7)	1,7+/-0,8	96,4 +/- 0,7	2,3+/-0,8
E ⁵⁷⁸ C	----	----	1,7+/-0,6	100	3,45+/-0,12
L ²⁴⁵ C/E ⁵⁷⁸ C	----	----	2,1+/-0,3	100	0,37+/-0,002 ^b
La unión de ^{125}I -EGF se realizó como se describe en "Materiales y Procedimientos". Los datos se analizaron usando el programa RadLig de "Kell for Windows".					
(a): El número de receptores por célula se calculó a partir del $B_{\text{máx}}$ y el número de células/tubo en cada experimento de unión de ligando. Los resultados son el error promedio y típico de al menos tres experimentos separados.					
(b): El número de receptores determinado por análisis Scatchard ($B_{\text{máx}}$) fue menor del 10% del número de receptores estimado por FACS o por inmunotransferencia					

- 5 [0247] **Mutaciones CR2:** las mutaciones V⁵⁸³D y D⁵⁶³H se diseñaron para interrumpir las interacciones de bucle CR2/CR1. En la conformación amarrada, los grupos γ -metilo de la cadena lateral V⁵⁸⁷ están en estrecho contacto de van der Waals con Y²⁴⁶; La sustitución del Asp γ -carboxilo interrumpirá la interfaz CR1/CR2. De forma análoga, el γ -carboxilo de D⁵⁶³ es hidrógeno unido a Y²⁴⁶ en la conformación amarrada, y la sustitución de los grupos aspartato carboxilo con el imidazol de His debilitarán la interacción. En las células que expresan V⁵⁸³ D, hay un aumento
- 10 significativo en la proporción de sitios de unión a EGF de alta afinidad en comparación con las células que expresan el EGFR wt (12,6% frente al 2,6%, respectivamente). Esta tendencia también se observa en el mutante D⁵⁶³H, aunque en este caso la diferencia del wt no fue estadísticamente significativa (TABLA 3). Un aumento en la proporción de los sitios de alta afinidad es una indicación de un cambio en el equilibrio hacia los estados libres de los receptores, suponiendo que las mutaciones V⁵⁸³ D y D⁵⁶³ H debiliten las interacciones CR1/CR2. Para investigar la
- 15 posibilidad de crear un enlace disulfuro para unir covalentemente CR1 y CR2, se identificaron dos restos que tenían la distancia y la orientación de la cadena lateral apropiadas en la conformación amarrada: Leu²⁴⁵ y Glu⁵⁷⁸. Inicialmente, se hizo la mutación individual E⁵⁷⁸C y después la doble mutación L²⁴⁵C/E⁵⁷⁸C. De forma interesante, la cadena lateral E⁵⁷⁸ está cerca de las cadenas laterales de tanto L²⁴⁵ como P²⁴⁸, por lo que puede esperarse que la sustitución de E⁵⁷⁸C mejore el empaquetamiento de la interfaz de bucle de CR1/CR2 aumentando las interacciones
- 20 hidrófobas con estos restos. Experimentalmente, la mutación E⁵⁷⁸C suprime por completo la unión de EGF de alta afinidad sin afectar al número de sitios de baja afinidad (TABLA 3). La introducción de una cisteína en esta posición no parece afectar al plegamiento de cualquiera o ambos dominios ricos en cisteína: el anticuerpo dependiente de la conformación mAb528 se une al receptor mutante, y su fosforilación y señalización dependen aún de EGF (véase a continuación).
- 25
- [0248] **Mutaciones en bucle de CR1:** Se introdujeron tres sustituciones aminoacídicas diferentes (Phe, Trp y Asp) para Tyr²⁴⁶. La estructura cristalina sugiere que Y²⁴⁶ es crítico tanto para las interacciones CR1/CR1 como CR1/CR2 (Figura 9B, 9C). En la configuración amarrada, el bucle de CR1 interactúa estrechamente con el dominio CR2; Tyr²⁴⁶ hidrógeno se une con la cadena lateral carboxilo de Asp⁵⁶³. Asp⁵⁶³ se mantiene *in situ* por un pequeño puente con el ϵ -amino de Lys⁵⁸⁵. La mutación de Tyr²⁴⁶ con respecto a Phe elimina el enlace de H por lo que el amarre será más débil. El mutante Trp²⁴⁶ es demasiado grande para encajar en el sitio de unión de CR2 y, de hecho, interrumpirá el puente salino Lys⁵⁸⁵-Asp⁵⁶³. El reemplazo de Tyr²⁴⁶ con Asp conducirá a la pérdida de empaquetamiento hidrófobo, así como a una fuerte repulsión entre Asp²⁴⁶ y Asp⁵⁶³. Por lo tanto, todas las mutaciones deben lograr la conformación amarrada menos favorable. Para activar la cinasa de EGFR, el dímero contiguo debe formarse, de
- 35 manera que el hidroxilo de Tyr²⁴⁶ hidrógeno se una a la cadena opuesta (Figura 9). De hecho, en presencia de

ligando, el hidroxilo se une por H a la estructura en los restos Ser²⁶², Gly²⁶⁴ y C²⁸³. Estos tres enlaces de hidrógeno se perderán en los mutantes Phe²⁴⁶ y Asp²⁴⁶. El empaquetamiento entre Tyr²⁴⁶ y la cadena opuesta es ajustado, sin espacio para un residuo Trp: se espera que el dímero Trp²⁴⁶ no esté empaquetado estrechamente. De forma experimental, las tres mutaciones dieron como resultado pérdida de la unión de EGFR de alta afinidad (TABLA 3 y FIGURA 11), lo que sugiere un deterioro grave de la interacción CR1/CR1 que no se compensa por la liberación de la unión de CR1/CR2.

[0249] En conjunto, estas observaciones confirman que la unión del ligando a la forma "amarrada" del se produce con baja afinidad; la unión de EGF de baja afinidad parece ser independiente del posicionamiento relativo de los dominios L1 y L2. La inspección de la estructura cristalina indica que las superficies de unión de ligando de ambos dominios están disponibles tanto en las conformaciones amarradas como libras, por lo que la unión de baja afinidad presumiblemente refleja la unión a cualquier sitio, o a ambos sitios independientemente. Evidentemente, la liberación puede aumentar la proporción de receptores disponibles para la unión de alta afinidad. Es interesante apreciar que la conformación de alta afinidad requiere el bucle de CR1, influenciando presuntamente la yuxtaposición de L1 y L2 en el complejo dimérico.

[0250] **Dimerización del Receptor:** La unión de EGF al dominio extracelular del receptor conduce a la formación o estabilización del EGFR de la cinasa activa. La interacción CR1/CR1 inducida por ligando es necesaria para la formación de un complejo de EGFR activo: la delección del bucle de CR1 suprime la capacidad del EGFR-ECD de dimerizar, incluso en el contexto de un EGFR de longitud completa (4). Evidentemente, las mutaciones en los bucles de CR1 y CR2 tienen efectos significativos en la afinidad de unión de EGF (Figura 11 y TABLA 3): Era de interés determinar el efecto de estas mutaciones en la dimerización basal y mediada por ligando y la activación de cinasa. Las células se trataron con EGF y el enlazador cruzado homobifuncional impermeable a células BS³ durante 30 min a temperatura ambiente. Los lisados celulares se separaron por SDS-PAGE y se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpos anti-EGFR o anti-fosfotirosina. Los resultados se muestran en la figura 4 y se resumen a continuación.

[0251] Los mutantes del bucle de CR1 han reducido la dimerización dependiente de ligando; en particular, la mutación Y²⁴⁶D suprimió completamente la dimerización dependiente de ligando. Sin embargo, la dimerización basal únicamente se vio afectada ligeramente: Esto apunta a una función diferente de la conformación de Y²⁴⁶ en la interfaz de dimerización espontánea y mediada por ligando. Dada la falta completa de dímeros detectables en el receptor del bucle de Δ -CR1, en el que se elimina la totalidad del bucle de CR1 (4), es posible que otras regiones en este bucle contribuyan a la formación del dímero no ligado. El contenido de fosfotirosina de tanto los receptores mutantes Y²⁴⁶ monoméricos y diméricos también se redujo, lo que sugiere que, incluso cuando sí se forman dímeros, la conformación de ECD no permite la activación de la cinasa: incluso aunque puedan detectarse algunos dímeros espontáneos en el mutante Y²⁴⁶W, en ausencia de ligando no hay virtualmente fosforilación alguna del dímero. Evidentemente, la formación del dímero entrecruzable de ECD se reduce en todos los mutantes Y²⁴⁶. Es interesante apreciar que el contenido de fosfotirosina de los *monómeros* del mutante Y²⁴⁶ después de la estimulación de EGF se ve particularmente afectado (Figura 12C); puesto que los monómeros se generan presuntamente a partir de dímeros que no se han entrecruzado, pueden reflejar una sub-población de moléculas con interacciones alteradas (más débiles) en el complejo dimérico. Si las mutaciones Y²⁴⁶ afectan globalmente a la estabilidad del dímero, el impedimento de una reorientación de las subunidades del dímero, o la formación de oligómeros de mayor orden necesarios para la activación de la cinasa no pueden abordarse directamente en este sistema experimental.

[0252] Los mutantes CR2 tenían niveles normales de dimerización basal y dependiente de ligando. No se detectaron aumentos significativos en la proporción de dímeros para el EGFR mutante en el que el amarre CR1/CR2 se había debilitado, lo que sugiere que, incluso cuando las mutaciones conducen a una liberación, la formación del complejo dimérico entrecruzable a BS³-depende de la unión del ligando. La mutación de E⁵⁷⁸ con respecto a C introduce una cisteína desaparejada y puede conducir posiblemente a la formación de un dímero unido a disulfuro. Se ha investigado esta posibilidad usando enlaces cruzados de diferente longitud del brazo separador (BS³; 11,3 Å y Sulpho-EGS, 16,1 Å), así como analizando dímeros no entrecruzados en condiciones reductoras y nativas (datos no mostrados): No se descubrió evidencia alguna de dimerización espontánea del mutante E⁵⁷⁸C y se concluyó que Cys⁵⁷⁸ no conduce a la formación de enlaces disulfuro intercatenarios.

[0253] **Fosforilación de tirosina dependiente de ligando y señalización de MAPK:** Las interacciones de bucle de CR1/CR2 parecen estabilizar una conformación inactiva de cinasa del EGFR y evitan una activación espontánea (9). Se controló la fosforilación de tirosina basal y dependiente de EGF, así como activación de MAPK, en células que expresan los receptores mutantes. Los resultados se presentan en la Figura 13. La unión de ligando provoca algún aumento en el contenido de fosfotirosina de muchas moléculas del receptor mutante; sin embargo, la

activación específica de mutantes individuales (medida por la relación de la fosforilación de tirosina con respecto a la proteína del receptor y por la activación específica de MAPK: Figura 13B, 13C) varió significativamente. Todos los mutantes de CR2 se activaron mediante ligando a niveles similares al receptor wt. Incluso E⁵⁷⁸C, que tiene únicamente sitios de baja afinidad y, por lo tanto, debe producirse predominantemente en forma amarrada (inactiva), puede estimularse completamente a elevadas concentraciones de EGF (16 nM). Se ensayó la correlación entre la afinidad de unión de ligando y la señalización de los receptores mutantes de CR2 exponiendo las células a concentraciones en aumento de EGF (30 pM a 100 nM) y controlando la inducción de la fosforilación de tirosina y la activación de MAPK (Figura 14). En las células de expresión de E⁵⁷⁸C-EGFR, la fosforilación pico del EGFR y los transductores de señal Shc y MAPK se consiguió únicamente en concentraciones significativamente elevadas de EGF en comparación con el tipo wt. Por el contrario, la activación del receptor para las células de expresión de V⁵⁸³D y D⁵⁶³H-EGFR se produjo a concentraciones inferiores de EGF y después EGFR wt (Figura 14B, 14C). Estos resultados apoyan el concepto de que las mutaciones en el dominio CR2 afectan a la afinidad de unión pero no a los eventos posteriores que desencadenan la función del receptor. Incluso en cantidades de saturación de EGF, todos los mutantes Tyr²⁴⁶ tienen fosforilación de tirosina del receptor reducido en gran medida y activación de MAPK (Figura 13): la capacidad de formar una interacción de bucle de CR1/CR1 productiva es importante para la activación de la cinasa. Otras mutaciones puntuales con respecto al bucle de CR1 o sus regiones de anclaje (Y²⁵¹A, F²⁶³A) parece que han tenido efectos mínimos en la señalización de EGFR (5). Sin embargo, cuando tanto el bucle de CR1 como su sitio de anclaje se interrumpen (por ejemplo, mutante doble Y²⁵¹A/R²⁸⁵S: (5)), la señalización se interrumpe completamente. Estos autores también informan de una reducción en el nivel de unión de ligando, lo que sugiere que un acoplamiento del sitio de acoplamiento de la dimerización puede afectar a la capacidad de los dominios L1 y L2 para la reorientación en respuesta a EGF.

[0254] Señalización mitogénica de mutantes EGFR. Por último, la funcionalidad de EGFR se mide por su capacidad para estimular respuestas biológicas. Estas respuestas dependen de una serie de parámetros, incluyendo afinidad de unión de ligando, fuerza de la activación de cinasa, magnitud de la activación de cinasa, duración de la señalización. Se han ensayado los mutantes de EGFR para determinar su capacidad para inducir la síntesis de ADN "de novo" tras la exposición a concentraciones en aumento de EGF, usando un ensayo de incorporación de [³H]timidina. Los resultados se presentan en la Figura 15 y la TABLA 4. En primer lugar, ninguna de las líneas celulares mostró incorporación de [³H]timidina independiente de ligando: es evidente que incluso cuando el amarre entre el bucle de CR1 y CR2 se ha debilitado, la señalización mitogénica requiera la unión de EGF para la activación de receptor. Aunque generalmente la EC₅₀ para EGF se relaciona bien con la ocupación del receptor de alta afinidad (véase la TABLA 3 y la TABLA 4), en el caso de E⁵⁷⁸C hay una diferencia de 10 veces entre la concentración del EGF requerido para la incorporación de [³H]timidina media máxima y para la ocupación media máxima de los receptores. Se ha establecido que, en las líneas celulares BaF/3 que expresan EGFR wt, como mínimo han de activarse 500 R/célula para conseguir una respuesta media máxima a EGF (véase Walker y col. 1998, para la metodología); este umbral se alcanza para EGFR wt a ~15 pM y para las células E⁵⁷⁸C a ~ 80 pM de EGF (TABLA 4). Usando los mismos cálculos (en base al número total de receptores/célula y la ocupación fraccional de cada concentración de EGF) se ha calculado que el mutante Y²⁴⁶W debe alcanzar una respuesta media máxima a una concentración de EGF de ~60 pM, y el mutante Y²⁴⁶D a una concentración de ~ 400 pM. La falta completa de respuesta a EGF de estos mutantes en el ensayo mitogénico refleja la incapacidad de estos EGFR para formar una unidad de señalización productiva en lugar de una simple pérdida de afinidad de unión de ligando.

TABLA 4

Respuesta mitogénica a EGF en EGFR wt y mutante			
Línea Celular	% de incorporación ^(a)	EC ₅₀ para EGF ^(b) (pM)	[EGF] en el que se ocupan 500 R/célula ^(c) (pM)
wt-EGFR	100	12	16
Mutantes CR1:			
Y ²⁴⁶ F	16	30	30
Y ²⁴⁶ W	0	-----	60
Y ²⁴⁶ D	0	-----	400
Mutantes CR2:			
V ⁵⁸³ D	100	6	<1
D ⁵⁶³ H	90	5	8
E ⁵⁷⁸ C	100	100	80

Las células BaF/3 que expresan EGFR wt o mutante se expusieron a concentraciones en aumento de EGF (0-10 ng/ml, 0-1,7 M) y síntesis de ADN medida por la incorporación de [³H]Timidina como se detalla en la sección Procedimientos Experimentales.

(a) La respuesta de las wtEGFR-células BaF/3 en EGF 1 nM se consideró como máxima. **(b)** EC₅₀ se determinó a partir de las curvas dosis-respuesta como se muestra en la Figura 7. **(c)** La concentración de EGF necesaria para ocupar 500 R/célula se calculó a partir de los datos de K_d y B_{máx} obtenidos por análisis Scatchard, usando una representación de la ocupación del receptor frente a la concentración de EGF. El número de EGFR ocupados en cada concentración de EGF se calculó a partir de la fórmula

$$([L]/[L] + K_{d1}) \times R_1 + ([L]/[L] + K_{d2}) \times R_2$$

donde [L] = concentración de EGF; K_{d1} y K_{d2} = constantes de unión de equilibrio; R₁ y R₂ = número de receptores de alta y baja afinidad.

Los datos son representativos de al menos tres experimentos separados

- 5 **[0255] Monitorización de anticuerpos de conformaciones de EGFR.** Los resultados presentados hasta ahora apoyan un modelo en el que las interacciones entre el bucle de CR1 y el dominio CR2 restringen el EGFR a un estado inactivo de baja afinidad de la cinasa (9), y la interacción de los bucles de CR1/CR1 es necesaria para la activación de la cinasa inducida por ligando del EGFR (4; 5). Aún no está claro si también existe un estado "intermedio" (como se sugirió por Ferguson y col., (9)), y cuales pueden ser sus propiedades. Se espera que esta
- 10 forma del receptor sea libre, con mayor afinidad, dimerica e inactiva de cinasa. En ausencia de ligando, será poco probable que se formen interacciones CR1-CR1 correctas, o serán demasiado transitorias para realizar la activación de cinasa.
- [0256]** Se ha usado el anticuerpo monoclonal 528 (19) como un anticuerpo competitivo para la unión de EGF al receptor de EGF humano. Aunque el epítipo exacto para mAb528 ha de mapearse aún, mAb528 reacciona con el Δ2-7 EGFR (que carece de L1 y la mayor parte de dominios CR1: (40)) e interfiere con la unión de ligando al wtEGFR, por lo que se supone que el epítipo reside en el dominio L2. El anticuerpo es específico para el EGFR humano y reconoce únicamente el receptor plegado correctamente (es decir, no reacciona con la forma reducida del hEGFR en transferencias de Western). La reactividad de todos los mutantes usados en este estudio con mAb528
- 15 permanece intacta, y el número de receptores determinado por el análisis usando mAb528 o análisis Scatchard usando ¹²⁵I-EGF está normalmente en consonancia. Como se ha mencionado anteriormente, el mutante L²⁴⁵C/E⁵⁷⁸C, mientras que es completamente reactivo con mAb528, tiene únicamente el 10% del número esperado de sitios de unión de EGF de baja afinidad.
- 20 **[0257]** El anticuerpo monoclonal 806 reconoce el EGFR truncado Δ2-7, así como una subpoblación de wtEGFR en células que sobreexpresan el receptor (23;30) mAb806 es activo como un agente anti-tumoral en xenoinjertos de glioblastoma que expresan Δ2-7EGFR o carcinomas que sobreexpresan el wtEGFR (22; 41; 42). Se planteó que este anticuerpo reconoce selectivamente una forma activada del receptor (43). Los estudios acerca del ECD aislado del EGFR han mostrado que mAb806 reacciona con la forma truncada C-terminalmente inmovilizada en la superficie del ECD (aa 1-501) que carece del dominio CR2, pero no una forma truncada N-terminalmente (aa 303-621), lo que
- 25 sugiere que el epítipo se localiza hacia la parte C-terminal del dominio CR1 (Johns y col., manuscrito presentado).
- 30

mAb806 reacciona débilmente con la superficie de las células BaF/3 que expresan ~40.000 wtEGFR/célula, sin embargo, las células BaF/3 que expresan un número similar de los receptores $\Delta 2-7$ (que carecen de L1 y mayor parte de los dominios CR1) se unen fuertemente a mAb806 (Figura 16). Curiosamente, el mutante del bucle de $\Delta CR1$ (que carece de los aa 244-259: (4)) tiene una fuerte reactividad a mAb806. Asumiendo que mAb528 puede reconocer todos los EGFR correctamente plegados sobre la superficie celular, usando análisis FACS, es posible determinar la proporción de los EGFR reactivos con mAb806 calculando la relación en la fluorescencia media de mAb806 con respecto a mAb528: Es posible una comparación directa porque se usan ambos anticuerpos a concentraciones saturadas, la unión se detecta por el mismo anticuerpo secundario (Ig anti-ratón acoplada a Alexa 488) y la detección FACS es lineal en el rango usado. Usando este análisis, la proporción de receptores reactivos con mAb806 varía del 6-8% para el wtEGFR al 70-90% para el EGFR $\Delta 2-7$ y en bucle de $\Delta CR1$ (relaciones de la unión de mAb806 con respecto a mAb528 de 0,06-0,08 y 0,069-0,98: Figura 14 y datos no mostrados). En su conjunto, los datos para el ECD aislado y para los receptores celulares sugieren que el epítipo reside en la parte más C-terminal del dominio CR1 y puede enmascarse por la conformación nativa del receptor wt, pero se expone por delección del bucle de CR1. De hecho, el mapeo del epítipo de mAb806 sobre la estructura cristalina del EGFR-ECD muestra que se sitúa inmediatamente C-terminal del bucle de CR1 (véase la Figura 9B, 9C): Por lo tanto, es probable que el epítipo de mAb806 quede sepultado en la interfaz CR1/CR1 en la forma dimérica contiguo. El epítipo de mAb806 también quedará parcialmente sepultado en la forma amarrada del receptor. Es probable que esté disponible el epítipo mAb806 únicamente en la forma libre "intermedia" putativa del receptor, donde no se enmascara por interacciones en bucle de CR1/CR2 o bucles de CR1/CR1. Por lo tanto, este anticuerpo puede proporcionar una sonda conformacional sensible para analizar complejos de EGFR amarrados, libres y completamente activos. Para probar esta hipótesis, se ha controlado la reactividad de mAb806 con células que expresan wtEGFR antes y después de una preincubación con mAb806 o con EGF. Si mAb806 reconoce la forma intermedia del receptor, y la forma intermedia está en equilibrio dinámico con los estados amarrado (bucle de CR1/CR2) y libre CR1/CR1, la preincubación con el anticuerpo debe cambiar el equilibrio hacia esta especie y, por lo tanto, debe aumentar la reactividad. La incubación con EGF, favoreciendo la formación de la interfaz CR1/CR1, deberá disminuir la reactividad. El wtEGFR/células Baf se expusieron a mAb806 en presencia del óxido de fenilarsina inhibidor de la internalización (29) a 37 °C (para maximizar la energía del sistema), o al EGF a 4 °C para permitir la formación del estado activo de la cinasa pero excluyen por completo la internalización. El tratamiento con mAb806 no alteró el número total de EGFR (como se determinó por unión a ^{125}I -EGF) y en ambas condiciones estuvieron presentes más del 95% de los EGFR en la superficie celular (datos no mostrados). Después del pretratamiento con mAb806, EGF o el tampón de control, la reactividad de EGFR wt con mAb528, mAb806 o anticuerpos de control se midió mediante análisis FACS. La TABLA 5 muestra los cambios en el canal de fluorescencia media causados por el tratamiento con mAb806 o EGF, así como las relaciones entre la reactividad de mAb806 y 528. Este procedimiento de presentación de los datos se escogió para superar variaciones entre los experimentos en los valores de fluorescencia media absolutos (que son muy sensibles a los pequeños cambios en la corriente del láser y en la configuración del detector) y para permitir la agrupación de los datos experimentales. La preincubación de las células a 37 °C durante una hora con 10 μ g/ml de mAb806 duplicó con creces la reactividad con mAb806 sin afectar a la reactividad de 528; por lo tanto, la relación entre los dos anticuerpos se elevó significativamente. La preincubación con mAb528 en condiciones idénticas no tuvo efecto alguno sobre la unión posterior de mAb528 o mAb806 (datos no mostrados). En experimentos separados se demostró que la unión de mAb806 mejorada no pudo atribuirse a la falta de saturación, ya que el aumento de la concentración de mAb806 (de 10 μ g/ml a 50 μ g/ml) o el tiempo de exposición (de 20 minutos a 1 h) durante la segunda incubación tuvo efectos insignificantes (datos no mostrados). El efecto de la preincubación con mAb806 fue dependiente del tiempo y la temperatura, alcanzando un máximo después de 3 h de preincubación a 37 °C (datos no mostrados). Estos resultados son compatibles con la captura por parte de mAb806 de una forma libre transitoria del receptor de EGFR. Por el contrario, la preincubación de las células en EGF disminuye drásticamente la reactividad con mAb806. La internalización del receptor en estas condiciones es <5%, por lo tanto no puede contribuir significativamente al descenso en la unión de mAb806. En estos experimentos, la reactividad con mAb528 también se redujo en ~20% después de la unión de EGF a través de impedimento estérico o enmascaramiento del epítipo. En su conjunto, estos resultados apuntan a un reconocimiento selectivo por parte de mAb806 de una forma libre no ligada del receptor.

TABLA 5

Variación en el canal de fluorescencia media para wtEGFR-células BaF/3 tras la preincubación con mAb806 o EGF			
Sonda con anticuerpo:	Cambio (%) en la reactividad del anticuerpo después de la preincubación		
	Tampón	Preincubación: mAb806 ^(a)	EGF ^(b)
528	-----	-3+/-2	-23+/-2
806	-----	+163+/- 87	-48+/-11
Relación = (mAb806-control) (mAb528-control)	0,06+/-0,02	0,196+/-0,09	0,036+/-0,01
Las células BaF/3 que expresaban el wtEGFR se preincubaron con tampón de control, con mAb806 (10 µg/ml a 37 °C durante 1 h: (a)) o con EGF (10 ng/ml a 4 °C durante 15 min (b)). Después, las células se sondearon con mAb806 o mAb528 (ambos a 10 µg/ml) seguido de Ig anti-ratón marcada con Alexa488 como se describe en la sección Procedimientos Experimentales. Las células se analizaron en un FACScan y los valores de fluorescencia media se obtuvieron usando el programa de análisis estadístico de CellQuest. Los valores de fluorescencia media después de la preincubación mock fueron 112+/-21 para mAb528, 7+/-1,9 para mAb806 y 0,5+/-0,3 para el anticuerpo irrelevante de control (clase equivalente). Los valores de control negativos se restaron de todos los datos. Los resultados se presentan como cambios porcentuales positivos o negativos en la fluorescencia media para las muestras de ensayo en comparación con las muestras mock. También se presentan las relaciones entre la fluorescencia media para mAb806 y para mAb528. Los datos son medias y errores típicos de tres experimentos separados.			

- 5 [0258] El análisis de la unión de mAb806 a los mutantes en bucle de CR1 o CR2 (TABLA 4) sostiene lo siguiente: La reactividad de mAb806 era al menos el doble que la de wtEGFR en mutantes con una interacción en bucle de CR1/CR2 debilitada (V⁵⁸³D y D⁵⁶³H), alrededor de tres veces mayor que el wtEGFR para receptores incapaces de formar la interacción CR1/CR1 (mutantes Y²⁴⁶). La incubación con EGF tuvo efectos opuestos sobre las dos clases de mutantes: EGF redujo la reactividad con mAb806 de los receptores capaces de formar el dímero activo (wt y
- 10 todos los mutantes CR2) mientras que la reactividad con mAb806 permaneció inalterada o incluso mejoró para los mutantes en bucle de CR1. El efecto del EGF sobre estos mutantes es coherente con una liberación mediada por EGF de una interacción débil en bucle de CR1/CR2, en compañía de un fallo al formar la interacción de los bucles de CR1/CR1. La modulación de la reactividad de mAb806 por EGF se correlaciona bien con la capacidad, o el fallo, de los EGFR mutantes de activar la cinasa de EGFR, como se determinó por la fosforilación de tirosina y por la
- 15 incorporación de ADN (véase la Figura 15 y la TABLA 6). Los datos concuerdan con un modelo en el que mAb806 reconoce preferiblemente una forma libre del EGFR, que aún tiene que configurarse con respecto a la conformación del dímero contiguo. Por lo tanto, puede usarse mAb806 como una herramienta para controlar los cambios conformacionales en el receptor tras la unión de ligando. Las conformaciones transitorias, libres y no ligadas del EGFR representaran, en cualquier momento dado, una pequeña proporción de los EGFR total pero estarán
- 20 presentes en cantidades detectables en células que sobreexpresan el receptor, como se indica en la bibliografía (22; 23; 30). Los datos también ayudan a explicar la capacidad de mAb806 para suprimir la formación de tumor: En las células que expresan el Δ2-7EGFR, la unión del anticuerpo impedirá estéricamente la formación de la conformación activa de cinasa del complejo del receptor, mientras que en las células que sobreexpresan el wtEGFR, puede atrapar la forma de EGFR libre e impedir la interacción entre los bucles de CR1 y la activación consecuente.
- 25 Esta hipótesis concuerda con el descenso indicado de la activación de la cinasa del Δ2-7 EGFR después del tratamiento con mAb806 (42).

TABLA 6

Reactividad de mAb806 con células que expresan EGFR wt o mutante: cambios en la respuesta a mAb806 o EGF.			
Líneas celulares	Relación de la unión de mAb806 con respecto a mAb528 en mutantes de EGFR con respecto a wtEGFR		
	Preincubación:		
	Tampón	mAb806	EGF
wt-EGFR	1	2,6+/-0,9	0,67+/-0,07
Mutantes CR1:			
Y ²⁴⁶ F	2,9+/-0,5	4,5+/-0,8	2,4+/-0,9
Y ²⁴⁶ W	3,2+/-0,5	3,8+/-0,7	5,7+/-2,6
Y ²⁴⁶ D	3,0+/-0,5	5,6+/-0,57	3,8+/-1,4
Mutantes CR2:			
V ⁵⁸³ D	2,2+/-0,4	4,0+/-1,2	1,0+/-0,4
D ⁵⁶³ H	2,3+/-0,27	4,2+/-1	0,7+/-0,2
E ⁵⁷⁸ C	1,3+/-0,4	2,8+/-1,2	1,1+/-0,05
Las células BaF/3 que expresan los EGFR wt o mutantes se procesaron como se describe en la TABLA 3. Los valores de fluorescencia media y las relaciones entre las reactividades de mAb806 y mAb528 se calcularon como se ha descrito en la TABLA 3. La relación de mAb806/mAb528 para el wtEGFR tratado con tampón en cada experimento separado se tomó como 1, y todas las demás relaciones se dividieron por el valor de wtEGFR para permitir una comparación directa entre los mutantes y entre los experimentos separados. Los datos son medias y errores típicos de al menos cuatro experimentos separados.			

5 CONCLUSIONES

[0259] Las mutaciones diseñadas para ensayar la función de los amarres intra-receptor e inter-receptor (4; 6; 9) en el contexto del EGFR celular de longitud completa indican que: 1) El número de sitios de unión a EGF de alta afinidad se ve afectado en gran medida por el amarre de bucle de CR1/CR2, reflejando presuntamente el posicionamiento relativo de los dominios L1 y L2. El debilitamiento del amarre CR1/CR2 aumenta la proporción de los sitios de alta afinidad y el fortalecimiento del amarre del bucle de CR1/CR2 suprime la unión de alta afinidad (TABLA 3). A pesar de las diferencias significativas en las afinidades de unión a ligando entre el receptor celular de longitud completa y el ECD aislado, las interacciones CR1 y CR2 impulsan los mismos cambios relativos en las dos moléculas (véase Ferguson y col., (9) y estos datos). La modulación de la afinidad de EGFR por componentes intracelulares (36; 44-46), que se han atribuido a la modificación de los dominios de yuxtamembrana o cinasa del EGFR, debe entonces reflejar un equilibrio alterado entre los estados amarrado y libre. No está claro cómo las modificaciones de la porción intracelular del EGFR conducen a alteraciones en la conformación del dominio extracelular, y este será un reto interesante para el futuro. 2) La dimerización independiente de ligando (u oligomerización) del EGFR no se ve afectada significativamente por las mutaciones en los dominios del bucle de CR1 o CR2. El debilitamiento del amarre del bucle de CR1/CR2 no conduce a una dimerización constitutiva, ni refuerza el amarre disminuyendo este (Figura 12): por lo tanto, incluso cuando el bucle de CR1 está disponible para interacciones inter-receptor (como se sugiere por los resultados de mAb806 en la TABLA 4), no se produce una dimerización productiva ni una activación (evaluada indirectamente por el contenido en fosfotirosina) sin unión de ligando. Sin embargo, la dimerización de EGFR mediada por ligando y la activación se ven afectadas por la mutación en bucle de CR1. Estos resultados indican que los dímeros constitutivos e inducidos por ligando no son equivalentes, y que la unión de ligando se requiere estrictamente para el posicionamiento fino de las subunidades de receptor y la consecuente activación de la cinasa (16). Tyr²⁴⁶ en el bucle de CR1 parece crucial para la formulación del complejo activado. Mientras que era formalmente posible que todas las mutaciones de Tyr²⁴⁶ bloquearan el receptor en la conformación amarrada, los resultados obtenidos usando el mAb806 específico de conformación (TABLA 6), apuntan en cambio a una incapacidad de los mutantes Tyr²⁴⁶ para orientar el complejo dímérico correctamente. 3) Se pudieron controlar los cambios significativos en la conformación del EGFR usando un anticuerpo, mAb806, que parece reconocer selectivamente la forma libre pero inactiva del EGFR. La interrupción de las interacciones CR1/CR2 aumenta la reactividad de mAb806, mientras que la unión de ligando la disminuye (TABLA 6). De forma interesante, tanto la mutación D⁵⁶³H como V⁵⁸³D y las mutaciones Y²⁴⁶ debilitaron la interacción CR1/CR2, conduciendo a una alta reactividad con mAb806. Además, los mutantes con las mutaciones de Tyr²⁴⁶ con mayor probabilidad de interrumpir la interacción CR1/CR1 (a triptógano y ácido aspártico) muestran un aumento significativo de la reactividad de mAb806 después de la unión de EGF, confirmando que la orientación CR1/CR1 activada se ve comprometida. 4) Siempre que se mantiene la capacidad para formar un dímero activo, las

respuestas a EGF se dictan únicamente por el equilibrio entre la afinidad y el número de receptores. Se ha demostrado que, en las células BaF/3 que expresan EGFR activables por ligando, han de ocuparse como mínimo 500 receptores/célula para estimular la síntesis de ADN media máxima (TABLA 4), y esto se relaciona con la estimulación umbral de los efectores de señalización en la dirección 3' tales como Shc y MAPK (Figura 13). Por lo tanto, mientras que la propia fosforilación de EGFR continúa para aumentar con la ocupación del receptor (y, por lo tanto, la dimerización dependiente de ligando y la activación), las rutas de señalización se activan completamente a una concentración de ligando mucho menor; de hecho, la estimulación mitogénica se produce a concentraciones de EGF donde la fosforilación de Shc y MAPK, pero no la fosforilación de EGFR, son fácilmente detectables.

- 10 **[0260]** Es evidente que el EGFR puede existir en múltiples estados, cada uno con diferentes características de unión a ligando y potencial para la activación por ligando: los cambios menores en los equilibrios entre estas formas pueden tener repercusiones importantes para la biología de EGFR, particularmente considerando cuán pocos receptores han de activarse para desencadenar completamente las cascadas de señalización en la dirección 3'. Se ha resumido el entendimiento de las conformaciones alternativas de EGFR y su función en la activación del receptor, en la figura 17.

REFERENCIAS

[0261]

- 20 1. Todaro, G. J., Delarco, J. E., and Cohen, S. (1976) *Nature* 264, 26-31
2. Schlessinger, J. (2002) *Cell* 110, 669-672
- 25 3. Burgess, A. W., Cho, H. S., Eigenbrot, C., Ferguson, K. M., Garrett, T. P., Leahy, D. J., Lemmon, M. A., Sliwkowski, M. X., Ward, C. W., and Yokoyama, S. (2003) *Mol Cell* 12, 541-552
4. Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Zhu, H. J., Walker, F., Frenkel, M. J., Hoyne, P. A., Jorissen, R. N., Nice, E. C., Burgess, A. W., and Ward, C. W. (2002) *Cell*. 110, 763-773
- 30 5. Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J. H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2002) *Cell*. 110, 775-787
6. Cho, H. S. and Leahy, D. J. (2002) *Science* 297, 13 30-1333
- 35 7. Cho, H. S., Mason, K., Ramyar, K. X., Stanley, A. M., Gabelli, S. B., Denney, D. W., Jr., and Leahy, D. J. (2003) *Nature* 421, 756-760
8. Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Kofler, M., Jorissen, R. N., Nice, E. C., Burgess, A. W., and Ward, C. W. (2003) *Mol Cell* 11, 495-505
- 40 9. Ferguson, K. M., Berger, M. B., Mendrola, J. M., Cho, H. S., Leahy, D. J., and Lemmon, M. A. (2003) *Mol Cell* 11, 507-517
- 45 10. Chantry, A. (1995) *J Biol Chem* 270, 3068-3073
11. Gadella, T. W. J. and Jovin, T. M. (1995) *Journal of Cell Biology* 129, 1543-1558
12. Sherrill, J. M. and Kyte, J. (1996) *Biochemistry* 35, 5705-5718
- 50 13. Sako, Y., Minoghchi, S., and Yanagida, T. (2000) *Nat. Cell Biol* 2, 168-172
14. Moriki, T., Maruyama, H., and Maruyama, I. N. (2001) *J Mol Biol* 311, 1011-1026
- 55 15. Yu, X. C., Sharma, K. D., Takahashi, T., Iwamoto, R., and Mekada, E. (2002) *Molecular Biology of the Cell* 13, 2547-2557
16. Zhu, H. J., Iaria, J., Orchard, S., Walker, F., and Burgess, A. W. (2003) *Growth Factors* 21, 15-30

17. Walker, F., Hibbs, M. L., Zhang, H. H., Gonez, L. J., and Burgess, A. W. (1998) *Growth Factors* 16, 53-67
18. Walker, F., Kato, A., Gonez, L. J., Hibbs, M. L., Pouliot, N., Levitzki, A., and Burgess, A. W. (1998) *Mol Cell Biol* 18, 7192-7204
- 5 19. Gill, G. N., Kawamoto, T., Cochet, C., Le, A., Sato, J. D., Masui, H., McLeod, C., and Mendelsohn, J. (1984) *J Biol Chem.* 259, 7755-7760
20. Stockert, E. and Old, L. J. (1995). *Annual Scientific Report, Ludwig Institute for Cancer Research*, 226-227.
- 10 21. Stockert, E. and Old, L. J. (1997) *Annual Scientific Report, Ludwig Institute for Cancer Research*, 212-213.
22. Johns, T. G., Luwor, R. B., Murone, C., Walker, F., Weinstock, J., Vitali, A. A., Perera, R. M., Jungbluth, A. A., Stockert, E., Old, L. J., Nice, E. C., Burgess, A. W., and Scott, A. M. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15871-15876
- 15 23. Johns, T. G., Stockert, E., Ritter, G., Jungbluth, A. A., Huang, H. J., Cavenee, W. K., Smyth, F. E., Hall, C. M., Watson, N., Nice, E. C., Gullick, W. J., Old, L. J., Burgess, A. W., and Scott, A. M. (2002) *Int.J Cancer* 98, 398-408
- 20 24. Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., Dull, T. J., Gray, A., Tam, A. W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T. A., Schlessinger, J., and. (1984) *Nature* 309, 418-425.
25. Walker, F., Hibbs, M. L., Zhang, H. H., Gonez, L. J., and Burgess, A. W. (1998) *Growth Factors* 16, 53-67
- 25 26. Daley, G. Q. and Baltimore, D. (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85,9312-9316
27. Burgess, A. W., Lloyd, C. J., and Nice, E. C. (1983) *EMBO J* 2, 2065-2069
28. Fracker, P. J and Speck, J. C. (1978) Protein and cell membrane iodination with a sparingly soluble chloramide, 1,3,4,6-tetrachloro 3a,6a-diprenylglycoluril. *Biochem.Byophys.Res.Commun.* 80, 849-857.
- 30 29. Knutson, V. P., Ronnett, G. V., and Lane, M. D. (1983) *J Biol Chem.* 258, 12139-12142
30. Jungbluth, A. A., Stockert, E., Huang, H. J., Collins, V. P., Coplan, K., Iversen, K., Kolb, D., Johns, T. J., Scott, A. M., Gullick, W. J., Ritter, G., Cohen, L., Scanlan, M. J., Cavenee, W. K., and Old, L. J. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 639-644
- 35 31. Elleman, T. C., Domagala, T., McKern, N. M., Nerrie, M., Lonqvist, B., Adams, T. E., Lewis, J., Lovrecz, G. O., Hoyne, P. A., Richards, K. M., Howlett, G. J., Rothacker, J., Jorissen, R. N., Lou, M., Garrett, T. P., Burgess, A. W., Nice, E. C., and Ward, C. W. (2001) *Biochemistry.* 40, 8930-8939
- 40 32. Berkers, J. A., van. Bergen en Henegouwen PP, and Boonstra, J. (1992) *J Recept.Res* 12, 71-100
33. Holbrook, M. R., Slakey, L. L., and Gross, D. J. (2000) *Biochem J* 352 Pt 1, 99-108
- 45 34. Roepstorff, K., Thomsen, P., Sandvig, K., and van Deurs, B. (2002) *J Biol Chem* 277, 18954-18960
35. Gulliford, T., Ouyang, X., and Epstein, R. J. (1999) *Cell Signal.* 11, 245-252
- 50 36. Arteaga, C. L., Ramsey, T. T., Shawver, L. K., and Guyer, C. A. (1997) *Journal of Biological Chemistry* 272, 23247-23254
37. Fowler, K. J., Walker, F., Alexander, W., Hibbs, M. L., Nice, E. C., Bohmer, R. M., Mann, G. B., Thumwood, C., Maglitto, R., Danks, J. A., and. (1995) *Proc Natl Acad Sci US A* 92, 1465-1469
- 55 38. Ringerike, T., Stang, E., Johannessen, L. E., Sandnes, D., Levy, F. O., and Madshus, I. H. (1998) *J Biol Chem* 273, 16639-16642
39. Van der Heyden, M. A., Nievers, M., Verkleij, A. J., Boonstra, J., and Van Bergen en Henegouwen PM (1997)

FEBS Lett 410, 265-268

40. Sugawa, N., Ekstrand, A. J., James, C. D., and Collins, V. P. (1990) Proc Natl Acad Sci U S A 87, 8602-8606

5 41. Luwor, R. B., Johns, T. G., Murone, C., Huang, H. J., Cavenee, W. K., Ritter, G., Old, L. J., Burgess, A. W., and Scott, A. M. (2001) Cancer Res 61, 5355-5361

42. Mishima, K., Johns, T. G., Luwor, R. B., Scott, A. M., Stockert, E., Jungbluth, A. A., Ji, X. D., Suvana, P., Volland, J. R., Old, L. J., Huang, H. J., and Cavenee, W. K. (2001) Cancer Res 61, 5349-5354

10

43. Schmidt, M. H., Furnari, F. B., Cavenee, W. K., and Bogler, O. (2003) Proc Natl Acad Sci U S A 100, 6505-6510

44. Olson, J. E. and Pledger, W. J. (1990) J Biol Chem 265, 1847-1851

15 46. Hosoi, K. and Edidin, M. (1989) Proc Natl Acad Sci U S A 86, 4510-4514

EJEMPLO 3

MAPEO FINO DE EPÍTOPO DE ANTICUERPOS ANTI-RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO -
20 EPIDÉRMICO A TRAVÉS DE MUTAGÉNESIS AL AZAR Y PRESENTACIÓN SOBRE SUPERFICIE DE LEVADURA

[0262] El mapeo fino de epítipo de los anticuerpos monoclonales terapéuticamente relevantes (mAbs) para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se realizó mediante mutagénesis al azar y presentación sobre superficie de levadura. Se construyó una biblioteca de presentación sobre superficie de levadura de mutantes
25 puntuales de un fragmento ectodominio de EGFR (restos 273-621) por mutagénesis al azar, y la biblioteca se clasificó según la unión reducida de un mAb de interés. Si un mutante de EGFR muestra pérdida de unión a un mAb, esto sugiere que el resto mutado es potencialmente un resto de contacto.

[0263] Usando este procedimiento, se han identificados restos clave energéticamente importantes para la unión de
30 mAb 806 a EGFR. El epítipo mAb 806 se localizó hacia un lado del bucle compuesto por los restos Cys287-Cys302, que queda limitado por un enlace disulfuro y dos puntos de sal. El epítipo mAb 806 como se identifica aquí no es completamente accesible en la conformación de monómero de de EGFR autoinhibido, que es coherente con la unión de mAb 806 a una forma transitoria de EGFR según este cambia de un monómero autoinhibido a extendido.

35 INTRODUCCIÓN

[0264] El mapeo epitópico es la determinación de restos de antígenos responsables de la mediación de las interacciones anticuerpo-antígeno. Los procedimientos previos de mapeo epitópico han implicado la expresión de fragmentos peptídicos sobre la superficie de un bacteriófago (1), *Escherichia coli* (2), o levadura (3), con el posterior
40 análisis de unión a anticuerpo. El mapeo de la unión de anticuerpo también se ha realizado a través de síntesis SPOT, donde los péptidos sintéticos se aplican puntualmente sobre membranas de celulosa y se ensayan para determinar la unión a anticuerpo (4). Las técnicas de presentación en fagos y SPOT se han utilizado para determinar los epítopos de diversos anticuerpos contra miembros de la familia del receptor ErbB (5, 6, 7). Sin embargo, los procedimientos basados en péptidos únicamente pueden identificar epítopos continuos y no conformacionales. Para
45 identificar un epítipo discontinuo, se ha usado espectrometría de masas de intercambio H/D para localizar un epítipo con respecto a fragmentos proteolíticos discontinuos (8).

[0265] Una herramienta útil en la disección de las interacciones proteína-proteína es la exploración de alanina, un procedimiento en el que los restos de interés mutan a alanina y se miden los cambios posteriores en la unión (9).
50 Esto requiere la expresión de proteínas solubles y la caracterización de cada mutante para asegurar el correcto plegamiento. La mutagénesis de exploración al azar es un procedimiento de alto rendimiento de la exploración de alanina que usa bibliotecas de presentación en fagos y se ha usado para el mapeo de paratopos y mapear interacciones proteína-proteína (10, 11). Sin embargo, el sistema de expresión no eucariota de este procedimiento puede no ser susceptible al mapeo epitópico de glicoproteínas eucariotas complejas, tales como el ectodominio del
55 receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que contiene 25 enlaces disulfuro y 10 sitios de glicosilación unidos a N (12).

[0266] EGFR es una glucoproteína transmembrana de 170 kDa y receptor de tirosina cinasa implicada en la regulación de la proliferación y la diferenciación celular (13, 14). EGFR (ErbB1, HER1) es un miembro de la familia

del receptor ErbB, que también incluye ErbB2 (HER2, Neu), ErbB3 (HER3) y ErbB4 (HER4). Varios ligandos, incluyendo el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformante α (TGF- α), se unen a los dominios I y III de la región extracelular para activar el EGFR a través de dimerización. El dominio II de la región extracelular está implicado en la mediación de los contactos de dimerización, y también forma un contacto
 5 autoinhibidor con el dominio IV en el estado monomérico (estructuras revisadas en (15)). Se ha observado sobreexpresión de EGFR en una amplia diversidad de neoplasias, incluyendo cánceres de cabeza y cuello, mama, vejiga, próstata, riñón y de pulmón de células no pequeñas (16). Esta sobreexpresión a menudo está relacionada con reducidas tasas de supervivencia y recurrencia tumoral y, por lo tanto, sirve como un indicador del pronóstico del paciente (17). Además, se ha observado una forma mutante de EGFR conocida como EGFR VIII, en la que los
 10 restos aminoacídicos 6-273 se eliminan y se inserta una glicina novedosa en la unión, en cánceres tales como glioblastoma multiforme (18). Por lo tanto, EGFR se ha convertido en una diana importante para el tratamiento del cáncer, y se han desarrollado diversos anticuerpos que se unen al dominio extracelular de EGFR para inhibir su función.

- 15 **[0267]** MAb 806 está en desarrollo preclínico y se ha demostrado que reconoce preferiblemente EGFR VIII y amplificado sobre EGFR de tipo salvaje (19; 22). Se ha demostrado que mAb 806 inhibe el crecimiento de xenoinjertos tumorales que expresan EGFR VIII o amplificado (23).

[0268] Recientemente, J.R. Cochran y col. informaron de un procedimiento para el mapeo epitópico de nivel de dominio usando fragmentos presentados sobre la superficie de levadura de EGFR (27). Se expresaron grandes fragmentos, incluyendo algunos múltiples dominios de EGFR, y se plegaron apropiadamente sobre la superficie de la levadura. Estos fragmentos se usaron para localizar la unión de anticuerpo en dominios particulares de EGFR tanto para epítomos continuos como discontinuos. La presentación sobre superficie de levadura es un procedimiento por el que una proteína de interés se expresa sobre la superficie de la levadura como una fusión a la proteína Aga2
 25 de levadura. El huésped eucariota da como resultado el tránsito de la proteína a través de la ruta secretora de levadura, permitiendo una isomerización de disulfuro eficiente y en control de la calidad del retículo endoplasmático (28). La presentación sobre superficie de levadura se ha usado para la expresión y estabilidad de ingeniería de proteínas (31, 32) de fragmentos de anticuerpos monocatenarios maduros de afinidad (29, 30) y para mostrar una biblioteca de anticuerpos humanos no inmunes para el cribado contra una diversidad de antígenos y haptenos (33).

30 **[0269]** En el presente trabajo, se desarrolla el mapeo epitópico de nivel de dominio y se usa una presentación sobre superficie de levadura para la resolución a nivel de restos más fina de interacciones de unión anticuerpo-antígeno. El trabajo anterior ha mostrado que mAb 806 se une a un epítipo situado en los restos de EGFR 273-621 (34). Partiendo de este fragmento, se fabricó una biblioteca de presentación sobre la superficie de la levadura de
 35 mutantes puntuales de EGFR 273-621 usando mutagénesis aleatoria. La biblioteca se clasificó según la pérdida de unión a mAb 806, y los clones se secuenciaron y se analizaron. Si un mutante de EGFR muestra pérdida de unión a mAb 806, esto sugiere que se ha perdido el contacto antígeno-anticuerpo en la mutación. Por lo tanto, el resto mutado es posiblemente un resto de contacto. Usando este procedimiento de dominio, se han identificado restos clave energéticamente importantes para la unión del mAb 806 terapéuticamente relevante a EGFR.

40 RESULTADOS

Construcción y clasificación de la biblioteca de mapeo epitópico

45 **[0270]** Se construyó una biblioteca de mapeo fino de epítomos usando mutagénesis aleatoria por PCR propenso a errores de baja velocidad de mutación del fragmento de EGFR 273-621. El fragmento contenía un c-myc.tag C-terminal para la detección con éxito de un mutante de EGFR mostrado sobre la superficie de la levadura. El tamaño de la biblioteca inicial fue de 5×10^5 clones, y la secuenciación de 100 clones no seleccionados indicó que el 72% eran EGFR de tipo salvaje, el 17% mutantes de aminoácidos individuales, y el 11% mutaciones múltiples o
 50 desplazamientos del marcado de lectura. Esto proporciona un tamaño de biblioteca relevante de $8,5 \times 10^4$, que es un orden de magnitud mayor que la diversidad teórica mayor de mutaciones de aminoácidos individuales de este fragmento de 349 restos ($6,6 \times 10^3$), y casi dos órdenes de magnitud mayores que las $1,0 \times 10^3$ mutaciones de nucleótidos individuales posibles. Dado el tamaño de esta biblioteca, cada aminoácido accesible en el código genético por una mutación de nucleótido individual debe representarse bien en la biblioteca. La biblioteca se transformó en levadura y se indujo para presentar los mutantes de EGFR sobre la superficie celular como fusiones a la proteína Aga2 de levadura. La biblioteca se marcó con una elevada concentración de mAb, al menos un orden de magnitud mayor que la constante de disociación aparente de tipo salvaje, permitiendo una diferenciación entre la unión de tipo salvaje y la pérdida de afinidad. Las células también se marcaron con IgY anti-c-myc de pollo para detectar la expresión de EGFR 273-621. Los mutantes que se representaron sobre la superficie de la levadura pero

mostraron pérdida de afinidad al mAb se aislaron (Figura 18A-B). Se espera que los mutantes toscamente mal plegados se reconozcan y se retengan por el aparato de control de calidad de la ruta secretora (31; 35), dando como resultado una inmunofluorescencia de c-myc de superficie celular significativamente reducida de estos mutantes. Después de observar un enriquecimiento suficiente de población, los clones mutantes de EGFR individuales se secuenciaron y se caracterizaron.

Identificación del epítipo mAb 806

[0271] Para el mapeo epitópico de mAb 806, la biblioteca se clasificó en 806 10 nM para la clase 1 y 75 nM para las clases 2 y 3, con secuenciación de clones individuales después de las clases 2 y 3. De los 100 clones secuenciados, aproximadamente el 20% contenía mutaciones múltiples y se omitieron de un análisis posterior. Los mutantes individuales aislados de la biblioteca por la pérdida de unión a mAb 806 se muestran en la columna izquierda de la TABLA 7. Todas las mutaciones se localizan en el bucle estabilizado por puentes disulfuro entre las cisteínas 287 y 302, como se ha determinado previamente (34). Sin embargo, se ha obtenido la resolución de nivel de restos e información adicional acerca del epítipo mAb 806 usando el presente procedimiento. Los mutantes con pérdida de unión a mAb 806 muestran una pérdida completa o parcial de unión (Figura 18B-C) en comparación con el tipo salvaje (Figura 18D) en 806 75 nM. Los mutantes se puntuaron de acuerdo con el grado de unión a 806 75 nM, indicando ++ la unión de tipo salvaje, + la pérdida parcial de unión, y - la pérdida completa de unión (TABLA 7, columna izquierda). Para verificar los resultados de la biblioteca de mapeo fino de epítipos, se realizó una exploración de alanina a través de mutagénesis dirigida a sitio (SDM) en todo el bucle 287-302 (TABLA 7, columna derecha). Todos los sitios con pérdida de unión por exploración de alanina (287, 293, 298 y 302) corresponden a mutantes aislados de la biblioteca. Por el contrario, los sitios con pérdida de unión a mAb únicamente tras la sustitución de un resto distinto de alanina (D297Y, R300C, R300P y K301E) no pueden identificarse por exploración de alanina, forman aún claramente un componente energéticamente importante del epítipo mAb 806. Puesto que son accesibles una media de 6-7 sustituciones aminoacídicas por mutagénesis de nucleótidos individuales, puede muestrearse un mayor intervalo de diversidad fisicoquímica en comparación con la exploración de alanina. Los mutantes con intensidad de marcado inmunofluorescente c-myc inalterada pero marcado reducido de mAb 806 en 75 nM pueden inferirse que tienen afinidad reducida para el anticuerpo. Con el fin de correlacionar cuantitativamente el marcado mAb 806 en 75 nM con constante de afinidad particulares, las titulaciones sobre la superficie de la levadura se realizaron en tres fragmentos de EGFR para determinar las constantes de disociación aparentes de mAb 806 para 273-621 de tipo salvaje (++), C287R (+) y E293K (-). Los resultados se muestran en la Figura 19. La constante de disociación de mAb 806 para 273-621 de tipo salvaje presente sobre la superficie de la levadura es 2,13 nM (intervalo de confianza al 68% de 1,83-2,50 nM), que concuerda con la afinidad descubierta mediante el análisis Scatchard de unión de mAb 806 a células que expresan EGFR VIII (19). La sustitución de C287R eleva esta constante de disociación a 127 nM (68% de intervalo de confianza de 103-160 nM), que da un valor $\Delta\Delta G$ de +2,4 kcal/mol en comparación con el tipo salvaje y, en cuanto a la exploración de alanina, es una pérdida intermedia de unión (36). La sustitución E293K conduce a un valor K_d de al menos 30 mM, correspondiente a un $\Delta\Delta G$ de +5,7 kcal/mol, lo que indica un "punto caliente" para unión. Los valores $\Delta\Delta G$ anteriores demuestran la importancia energética relativa de estas mutaciones y pueden usarse para calcular aproximadamente la importancia energética de otros mutantes en base a su puntuación de unión (++, + o -) en 806 75 nM.

TABLA 7

Mutaciones de unión a 806 identificadas por mutagénesis aleatoria o dirigida a sitio

Comparación de mutantes aislados de biblioteca según la pérdida de unión a mAb 806 y mutagénesis dirigida a sitio (SDM) en bucle 287-302. ++ indica unión de tipo salvaje; +, unión intermedia; y -, unión equivalente a control negativo (véase la Figura 18).

Mutante EGFR (Biblioteca)	Unión a mAb 806	Mutante EGFR (SDM)	Unión a mAb 806
C287G,R,S,W,Y	+	C287A	+
		G288A	++
		A289K	++
		D290A	++
		S291A	++
		Y292A	++
E293D,G	+	E293A	+
E293K	-		
		M294A	++
		E295A	++
		E296A	++
D297Y	+	D297A	++
G298D,S	-	G298A	+
		V299A,K	++
		V299D	-
R300C	+	R300A	++
R300P	-		
K301E	+	K301A	++
C302F,R,Y	+	C302A	-
C302G,S	-		

5 El epítipo mAb 806 está restringido

- [0272] Los residuos identificados como energéticamente importantes para la unión de mAb 806 se muestran en la Figura 20. Estos restos se agrupan a un lado del bucle 287-302, lo que indica que este es el epítipo mAb 806. De forma interesante, Val299 se sitúa en el centro de estos restos, pero no se identificó en la biblioteca o la exploración de alanina. Por lo tanto, se fabricaron los mutantes dirigidos a sitio V299K y V299D, y aunque el epítipo puede alojar un resto lisina sin efecto, una sustitución de ácido aspártico erradica la unión detectable (TABLA 7). Esto indica adicionalmente que es probable que mAb 806 contacte este lado del bucle 287-302. mAb 806 se une al EGFR desnaturalizado térmicamente y por SDS (34), lo que implicará un epítipo lineal; sin embargo, el epítipo no tiene una secuencia totalmente continua como se demuestra por el análisis de la biblioteca. Esto se explica mediante el examen de la estructura del bucle 287-302, que muestra que la cadena lateral de Glu293 se proyecta desde un lado del bucle a la otra cara de contacto putativa. El epítipo mAb 806 se limita por un enlace disulfuro y dos puentes de sal, Glu293-Arg300 y Asp297-Lys301 (Figura 20C). Los seis restos implicados en estas restricciones se aislaron de la biblioteca según la pérdida de unión a mAb 806, destacando la importancia de la naturaleza restringida del epítipo. La cisteína en la posición 287 tolera una amplia diversidad de sustituciones que conducen a una pérdida intermedia de unión (TABLA 7), lo que indica que su contribución energética al epítipo puede surgir más de la restricción del bucle en lugar del contacto con el anticuerpo. Sin embargo, la cisteína en la posición 302 puede ser más probablemente un resto de contacto ya que únicamente tolera sustituciones para restos más grandes con carácter aromático. El epítipo mAb 806 en el contexto de la estructura de monómero de EGFR autoinhibido se muestra en la Figura 20D. Parece que un sitio de unión a anticuerpo estará parcialmente bloqueado para el epítipo en esta conformación, acorde con la observación de que mAb 806 no se une a EGFR soluble, sino que se une a un mutante de EGFR "libre" interrumpido lejos de la conformación autoinhibida (34).

ANÁLISIS

- 30 [0273] Este trabajo describe un procedimiento novedoso del mapeo fino epitópico usando cribado de antígeno mutagenizado al azar presente sobre la superficie celular de la levadura. El procedimiento es capaz de identificar epítopos no lineales de anticuerpos que se unen a proteínas eucariotas complejas sin conocimiento previo de restos de contacto potenciales. Estas son varias ventajas con respecto a los procedimientos de mapeo epitópico de péptidos y la exploración de alanina. La plataforma de presentación sobre superficie de levadura facilita la expresión

proteica, sin la necesidad de expresar de forma soluble y purificar cada mutante individual. La caracterización de mutantes y la titulación también se realizan eficientemente sobre la superficie de la levadura. Este procedimiento fue capaz de identificar definitivamente el epítipo para mAb 806, cuyo epítipo no depende de una estructura terciaria. Debido a esto, todas las mutaciones individuales aisladas de la biblioteca según la pérdida de unión a mAb 806 se

[0274] Usando este procedimiento de mapeo epitópico, el epítipo para mAb 806 se localizó en un lado del bucle de disulfuro restringido 287-302, actuando Asp297-Cys302, Glu293, y posiblemente Cys287 como restos de contacto. Tal motivo estructural se ha descrito previamente como un nudo de cisteína, que es un bucle expuesto a la superficie limitado por disulfuro importante en la especificidad de unión (37). Los nudos de cisteína también se han identificado como epítipos antigénicos importantes en diversas proteínas, incluyendo la proteína G de virus respiratorio sincitial bovino y la proteína de hemaglutinina del virus del sarampión (38; 39). Esto sugiere que un bucle limitado por disulfuro es una estructura antigénica favorable; puesto que ya está restringido, hay un menor coste entrópico tras la unión a anticuerpo. Por lo tanto, varios bucles disulfuro distintos en EGFR son dianas de epítipos potenciales para la unión a anticuerpo. Se ha mostrado que mAb 806 presenta un aumento de la unión a EGFR en células que carecen del brazo de dimerización de dominio II. Por lo tanto, se presume que mAb 806 se une a una forma transitoria del receptor según cambia de una conformación de monómero autoinhibida a extendida (véanse los Ejemplos anteriores y (34)). Se cree que tras la unión de mAb 806, el monómero de EGFR ya no puede dimerizar ni activar el receptor, lo que explica su actividad anti-tumoral. El epítipo mAb 806 aquí presente concuerda con esta hipótesis. El epítipo únicamente es parcialmente accesible en la estructura monomérica autoinhibida, con los restos Glu293 y Cys302 ocultos por los restos del dominio II adyacentes (Figura 19D). Estos restos pueden llegar a exponerse tras una transición conformacional y permiten la unión de mAb 806. El epítipo mAb 806 de un monómero de EGFR está adyacente al otro en las estructuras dimericas de EGFR, y la unión de anticuerpo a este epítipo puede impedir estéricamente la dimerización de EGFR.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Construcción y expresión de la biblioteca de mapeo de epítipos

[0275] La biblioteca de mapeo epitópica se construyó usando el kit de mutagénesis al azar Stratagene GeneMorph® para proporcionar una baja velocidad de mutagénesis. La plantilla usada para la construcción de la biblioteca fue una estructura pCT302 que contenía el fragmento de EGFR 273-621, con una mutación C283A para impedir el desemparejamiento de disulfuro, insertada para la presentación en levadura (27). Los productos de PCR se purificaron con gel y se extrajeron usando un kit de extracción en gel Qiagen Qiaquick. La biblioteca se transformó en la cepa *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 (28) mediante electroporación (40) y recombinación homóloga (41) usando un aparato de transfección pulsador de genes Bio-Rad (Richmond, CA). La biblioteca final contenía aproximadamente una distribución Poisson de cambios de aminoácidos para el fragmento de EGFR como se demostró por recuperación plasmídica usando Zymoprep™ (Zymo Research) y secuenciación de 100 clones de biblioteca (MIT Biopolymers Laboratory). El crecimiento y la expresión de la biblioteca usando presentación sobre superficie de levadura se realizaron como se ha descrito previamente (28).

Marcado y clasificación de biblioteca

[0276] El anticuerpo monoclonal de ratón de EGFR anti-humano 806 se proporcionó generosamente por el Ludwig Institute for Cancer Research. La fracción de IgY de pollo anti-c-myc se adquirió en Molecular Probes (Eugene, OR). Una cantidad determinada de células de levadura (al menos 10 x tamaño de librería) se lavaron con tampón FACS (solución salina tamponada con fosfato que contenía 1 mg/ml de albúmina sérica bovina). Las células se incubaron con 4 µg/ml de IgY de pollo anti-c-myc y la concentración apropiada de mAb durante 30 min a 25 °C. Después, las células se lavaron tampón FACS y se incubaron con una dilución 1:25 de IgG de cabra anti-ratón marcada con ficoeritrina (Sigma) y una dilución 1:100 de IgG de cabra anti-pollo marcada con Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes) durante 30 min a 4 °C. Las células marcadas se aclararon, y las bibliotecas celulares se clasificaron usando una máquina MoFlo FACS en la plataforma científica de citometría de flujo del MIT.

Identificación y ensayo de clones individuales

[0277] Se recuperaron plásmidos de poblaciones de bibliotecas clasificadas usando Zymoprep™ y se secuenciaron en MIT Biopolymers Laboratory. Se fabricaron mutantes dirigidos a sitio usando mutagénesis dirigida a sitio QuickChange® (Stratagene). Se transformaron clones individuales en levadura usando EZ Yeast Transformation (Zymo Research) y se desarrollaron en un medio mínimo (base nitrogenada de levadura, hidrolizado de caseína,

dextrosa y tampón fosfato pH 7,4) durante una noche. La expresión de proteínas sobre superficie de levadura se indujo mediante transferencia a un medio mínimo con galactosa e incubación durante una noche. Para cada clon, se marcaron 1×10^6 células como anteriormente con IgY anti-c-myc de pollo, el mAb apropiado y anticuerpos fluorescentes secundarios. Los datos de fluorescencia se obtuvieron usando un citómetro de flujo Coulter Epics XL (Beckman-Coulter) y se analizaron usando el software DakoCytomation Summit™.

Titulación del fragmento de EGFR contra mAb806

[0278] Las células se desarrollaron y se indujeron como anteriormente. Se marcaron 1×10^6 células como antes usando la concentración apropiada de mAb 806, IgY de pollo anti-c-myc, y anticuerpos fluorescentes secundarios. Los datos de fluorescencia de la levadura positiva de c-myc se obtuvieron usando un citómetro de flujo Coulter Epics XL y se normalizaron por intensidades de fluorescencia media máximas y mínimas. Se asumió que la interacción de unión era un modelo de unión a sitio individual sin depleción de ligando. Los datos de titulación se ajustan a la ecuación

$$f_{mAb} = \frac{[mAb]}{[mAb] + K_d} \quad [\text{Eq. 1}]$$

donde f_{mAb} es la unión fraccional de mAb 806 a EGFR 273-621 presente sobre la superficie de la levadura, $[mAb]$ es la concentración de mAb 806, y K_d es la constante de disociación aparente. Se realizó un ajuste global de los tres conjuntos de datos usando Microsoft Excel, y se calcularon intervalos de confianza al 68% de acuerdo con (42).

Imágenes proteicas y cálculos del área superficial

[0279] Todas las imágenes proteicas de EGFR se generaron usando software PyMOL (DeLano Scientific LLC, en pymol.org). El área superficial accesible al disolvente de cada residuo de EGFR (PDB ID 1NQL) se calculó usando Getarea 1.1 (Sealy Center for Structural Biology, University of Texas Medical Branch, en scsb.uhnb.edu/cgi-bin/get_a_form.tcl). Se usó una sonda de agua con un tamaño de 1,0 para permitir la identificación correcta de restos de contacto de EGF situándose sobre la superficie. Los restos con un valor de 20 o superior se consideraron restos superficiales.

REFERENCIAS

[0280]

1. Mehra, V., Sweetser, D. & Young, R. A. (1986). Efficient mapping of protein antigenic determinants. Proc Natl Acad Sci U S A 83, 7013-7.
2. Christmann, A., Wentzel, A., Meyer, C., Meyers, G. & Kolmar, H. (2001). Epitope mapping and affinity purification of monospecific antibodies by Escherichia coli cellsurface display of gene-derived random peptide libraries. J Immunol Methods 257, 163-73.
3. Benichou, S. & Inchauspe, G. (1996). Random fragment libraries using yeast expression plasmid. Methods Mol Biol 66, 241-55.
4. Frank, R. & Overwin, H. (1996). SPOT synthesis. Epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. Methods Mol Biol 66, 149-69.
5. Wu, D. G., Wang, L. H., Sato, G. H., West, K. A., Harris, W. R., Crabb, J. W. & Sato, J. D. (1989). Human epidermal growth factor (EGF) receptor sequence recognized by EGF competitive monoclonal antibodies. Evidence for the localization of the EGF-binding site. J Biol Chem 264, 17469-75.
6. Yip, Y. L., Smith, G., Koch, J., Dubel, S. & Ward, R. L. (2001). Identification of epitope regions recognized by tumor inhibitory and stimulatory anti-ErbB-2 monoclonal antibodies: implications for vaccine design. J Immunol 166, 5271-8.
7. Yip, Y. L., Novotny, J., Edwards, M. & Ward, R. L. (2003). Structural analysis of the ErbB-2 receptor using

monoclonal antibodies: Implications for receptor signalling. *Int J Cancer* 104, 303-9.

8. Baerga-Ortiz, A., Hughes, C. A., Mandell, J. G. & Komives, E. A. (2002). Epitope mapping of a monoclonal antibody against human thrombin by H/D-exchange mass spectrometry reveals selection of a diverse sequence in a highly conserved protein. *Protein Sci* 11, 1300-8.
9. Cunningham, B. C. & Wells, J. A. (1989). High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Science* 244, 1081-5.
10. Weiss, G. A., Watanabe, C. K., Zhong, A., Goddard, A. & Sidhu, S. S. (2000). Rapid mapping of protein functional epitopes by combinatorial alanine scanning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8950-4.
11. Vajdos, F. F., Adams, C. W., Breece, T. N., Presta, L. G., de Vos, A. M. & Sidhu, S. S. (2002). Comprehensive functional maps of the antigen-binding site of an anti-ErbB2 antibody obtained with shotgun scanning mutagenesis. *J Mol Biol* 320, 415-28.
12. Zhen, Y., Caprioli, R. M. & Staros, J. V. (2003). Characterization of glycosylation sites of the epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* 42, 5478-92.
13. Ullrich, A. & Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, 203-12.
14. Jorissen, R. N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T. P., Ward, C. W. & Burgess, A. W. (2003). Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 284, 31-53.
15. Burgess, A. W., Cho, H. S., Eigenbrot, C., Ferguson, K. M., Garrett, T. P., Leahy, D. J., Lemmon, M. A., Sliwkowski, M. X., Ward, C. W. & Yokoyama, S. (2003). An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* 12, 541-52.
16. Yarden, Y. & Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 127-37.
17. Nicholson, R. I., Gee, J. M. & Harper, M. E. (2001). EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 37 Suppl 4, S9-15.
18. Sugawa, N., Ekstrand, A. J., James, C. D. & Collins, V. P. (1990). Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8602-6.
19. Johns, T. G., Stockert, E., Ritter, G., Jungbluth, A. A., Huang, H. J., Cavenee, W. K., Smyth, F. E., Hall, C. M., Watson, N., Nice, E. C., Gullick, W. J., Old, L. J., Burgess, A. W. & Scott, A. M. (2002). Novel monoclonal antibody specific for the de2-7 epidermal growth factor receptor (EGFR) that also recognizes the EGFR expressed in cells containing amplification of the EGFR gene. *Int J Cancer* 98, 398-408.
20. Sato, J. D., Kawamoto, T., Le, A. D., Mendelsohn, J., Polikoff, J. & Sato, G. H. (1983). Biological effects in vitro of monoclonal antibodies to human epidermal growth factor receptors. *Mol Biol Med* 1, 511-29.
21. Winkler, M. E., O'Connor, L., Winget, M. & Fendly, B. (1989). Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha bind differently to the epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* 28, 6373-8.
22. Jungbluth, A. A., Stockert, E., Huang, H. J., Collins, V. P., Coplan, K., Iversen, K., Kolb, D., Johns, T. J., Scott, A. M., Gullick, W. J., Ritter, G., Cohen, L., Scanlan, M. J., Cavenee, W. K. & Old, L. J. (2003). A monoclonal antibody recognizing human cancers with amplification/overexpression of the human epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 639-44.
23. Luwor, R. B., Johns, T. G., Murone, C., Huang, H. J., Cavenee, W. K., Ritter, G., Old, L. J., Burgess, A. W. & Scott, A. M. (2001). Monoclonal antibody 806 inhibits the growth of tumor xenografts expressing either the de2-7 or amplified epidermal growth factor receptor (EGFR) but not wild-type EGFR. *Cancer Res* 61, 5355-61.
24. Goldstein, N. I., Prewett, M., Zuklys, K., Rockwell, P. & Mendelsohn, J. (1995). Biological efficacy of a chimeric

antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* 1, 1311-8.

25. Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Zhu, H. J., Walker, F., Frenkel, M. J., Hoyne, P. A., Jorissen, R. N., Nice, E. C., Burgess, A. W. & Ward, C. W. (2002). Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell* 110, 763-73.
26. Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J.H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M. & Yokoyama, S. (2002). Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 110, 775-87.
27. Cochran, J. R., Kim, Y. S., Olsen, M. J., Bhandari, R. & Wittrup, K. D. (2004). Domain-level antibody epitope mapping through yeast surface display of epidermal growth factor receptor fragments. *J Immunol Methods* 287, 147-58.
28. Boder, E. T. & Wittrup, K. D. (2000). Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability. *Methods Enzymol* 328, 430-44.
29. Boder, E. T. & Wittrup, K. D. (1997). Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol* 15, 553-7.
30. Boder, E. T., Midelfort, K. S. & Wittrup, K. D. (2000). Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10701-5.
31. Shusta, E. V., Kieke, M. C., Parke, E., Kranz, D. M. & Wittrup, K. D. (1999). Yeast polypeptide fusion surface display levels predict thermal stability and soluble secretion efficiency. *J Mol Biol* 292, 949-56.
32. Shusta, E. V., Holler, P. D., Kieke, M. C., Kranz, D. M. & Wittrup, K. D. (2000). Directed evolution of a stable scaffold for T-cell receptor engineering. *Nat Biotechnol* 18, 754-9.
33. Feldhaus, M. J., Siegel, R. W., Opresko, L. K., Coleman, J. R., Feldhaus, J. M., Yeung, Y. A., Cochran, J. R., Heinzelman, P., Colby, D., Swers, J., Graff, C., Wiley, H. S. & Wittrup, K. D. (2003). Flow-cytometric isolation of human antibodies from a nonimmune *Saccharomyces cerevisiae* surface display library. *Nat Biotechnol* 21, 163-70.
34. Johns, T. G., Adams, T. E., Cochran, J. R., Hall, N. E., Hoyne, P. A., Olsen, M. J., Kim, Y. S., Rothacker, J., Nice, E. C., Walker, F., Old, L. J., Ward, C. W., Burgess, A. W., Wittrup, K. D. & Scott, A. M. (2004). Identification of the epitope for the EGFR-specific monoclonal antibody 806 reveals that it preferentially recognizes an untethered form of the receptor. *J Biol Chem*.
35. Ellgaard, L. & Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 181-91.
36. Bogan, A. A. & Thorn, K. S. (1998). Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J Mol Biol* 280, 1-9.
37. Laphom, A. J., Janes, R. W., Isaacs, N. W. & Wallace, B. A. (1995). Cystine nooses and protein specificity. *Nat Struct Biol* 2, 266-8.
38. Langedijk, J. P., Melen, R. H., Taylor, G., Furze, J. M. & van Oirschot, J. T. (1997). Antigenic structure of the central conserved region of protein G of bovine respiratory syncytial virus. *J Virol* 71, 4055-61.
39. Putz, M. M., Hoebeke, J., Ammerlaan, W., Schneider, S. & Muller, C. P. (2003). Functional fine-mapping and molecular modeling of a conserved loop epitope of the measles virus hemagglutinin protein. *Eur J Biochem* 270, 1515-27.
40. Meilhoc, E., Masson, J. M. & Teissie, J. (1990). High efficiency transformation of intact yeast cells by electric field pulses. *Biotechnology (N Y)* 8, 223-7.
41. Raymond, C. K., Pownder, T. A. & Sexson, S. L. (1999). General method for plasmid construction using homologous recombination. *Biotechniques* 26, 134-8, 140-1.

42. Lakowicz, J. R. (1999). Principles of fluorescence spectroscopy. 2nd edit, Kluwer Academic/Plenum, New York.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado que consiste en la secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en:
5 (i) la secuencia expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-10; y
(ii) una variante o mutante de la secuencia expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-10,
en la que un aminoácido se ha sustituido por un aminoácido conservativo o no conservativo.
10
2. Uso del péptido aislado de la reivindicación 1 para generar un anticuerpo o fragmento de unión a
antígeno del mismo en animales no humanos que es capaz de reconocer el EGFR que se encuentra en células
tumorigénicas, hiperproliferativas o anormales y no es detectable en células normales o de tipo salvaje.
15
3. El uso de la reivindicación 2, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo tiene actividad anti-
tumoral.
20
4. El uso de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo es un
anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo.
25
5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se
marca con un marcador detectable.
30
6. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se
fija o se conjuga a una o más moléculas o agentes diferentes que tienen un fin terapéutico o diagnóstico.
35
7. El uso de la reivindicación 6, en el que dicha una o más moléculas o agentes diferentes se
seleccionan entre toxinas, ligandos, isótopos radioactivos, agentes quimioterapéuticos y otros anticuerpos o
fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno.
40
8. El uso de la reivindicación 2-7, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se prepara en una
composición farmacéutica.
45
9. Un procedimiento *in vitro* para seleccionar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo
que es inmunorreactivo con un epítipo expuesto en células que expresan EGFR anormal o sobreexpresado, pero no
expuesto en células de tipo salvaje, en el que el procedimiento comprende el cribado de anticuerpos o células que
expresan anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno con el péptido aislado de la reivindicación 1.
50
10. Una composición farmacéutica que comprende uno o más de los péptidos de la reivindicación 1 y un
vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. Una composición inmunogénica que comprende uno o más de los péptidos de la reivindicación 1 y un
adyuvante farmacéuticamente aceptable.
12. Un ácido nucleico aislado que codifica el péptido aislado de la reivindicación 1.
13. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 12.
14. Un sistema vector huésped que comprende el vector de la reivindicación 13.

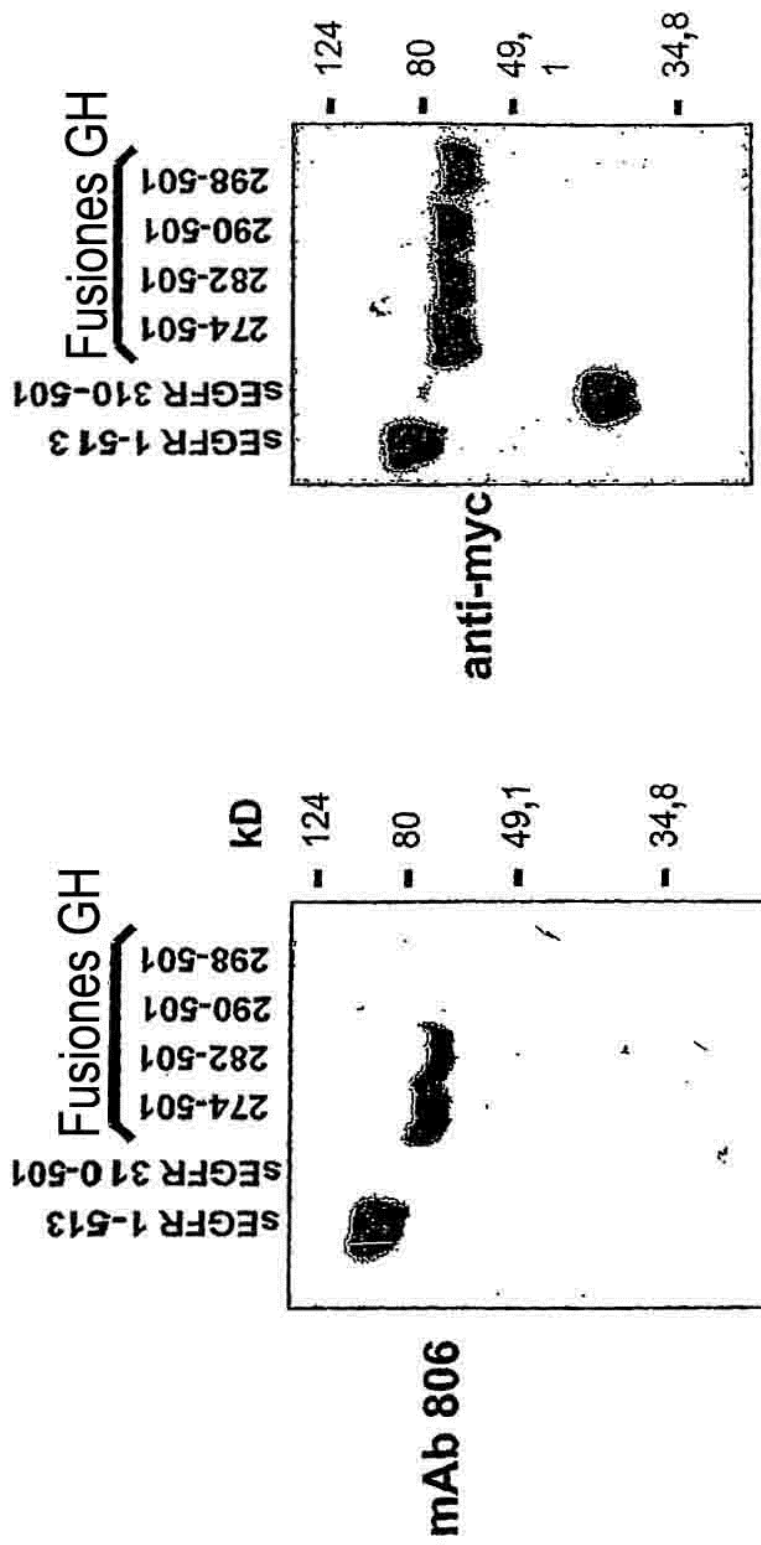


FIG. 1

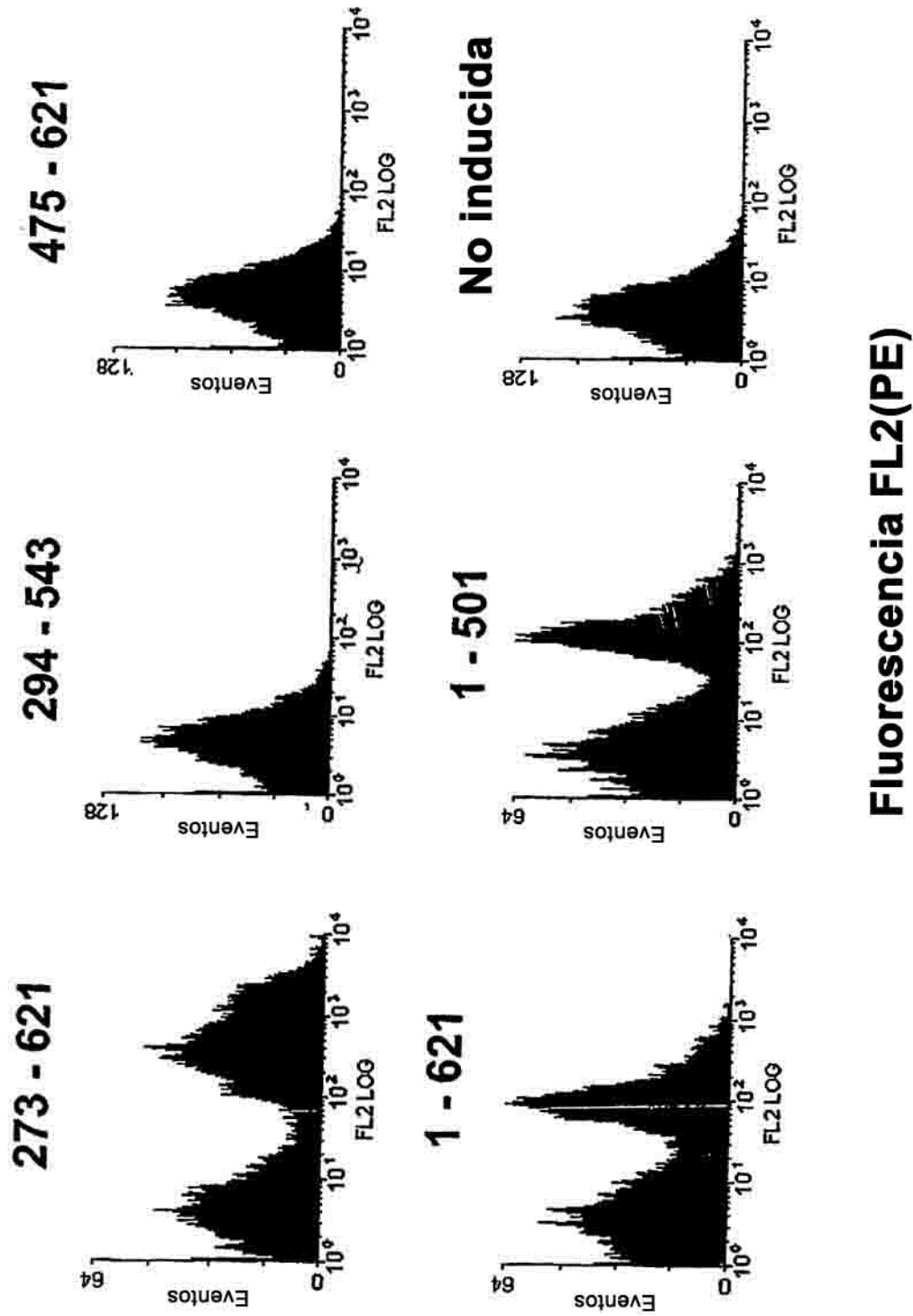


FIG. 2A

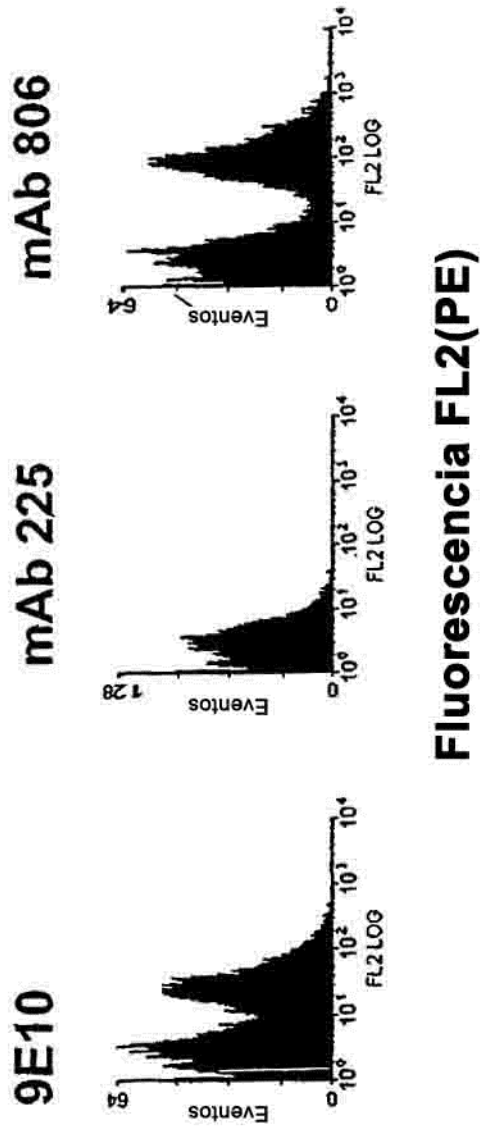


FIG. 2B

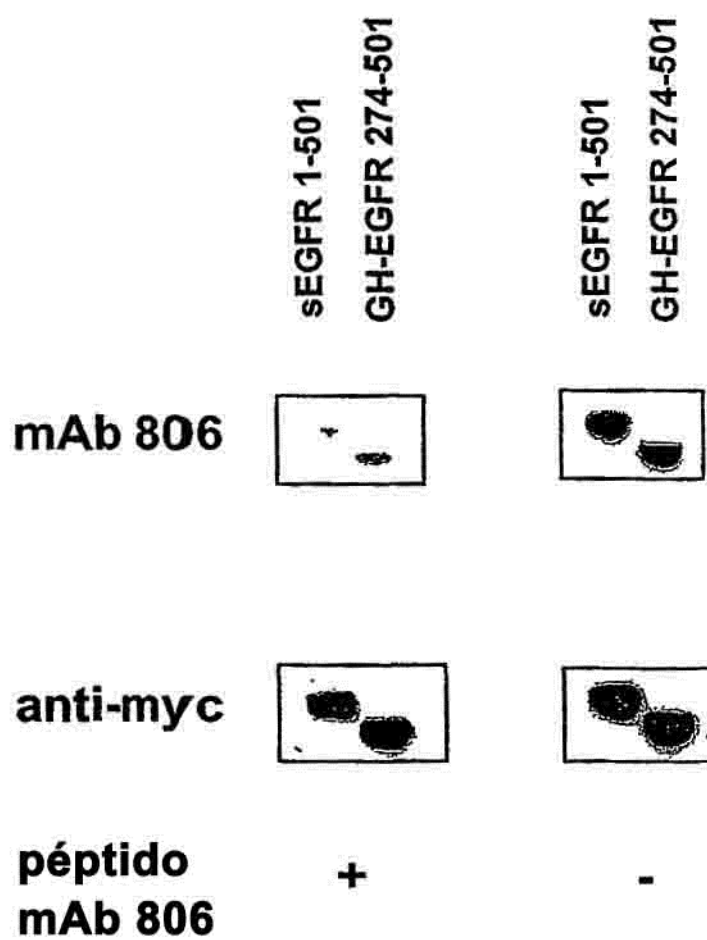


FIG. 3A

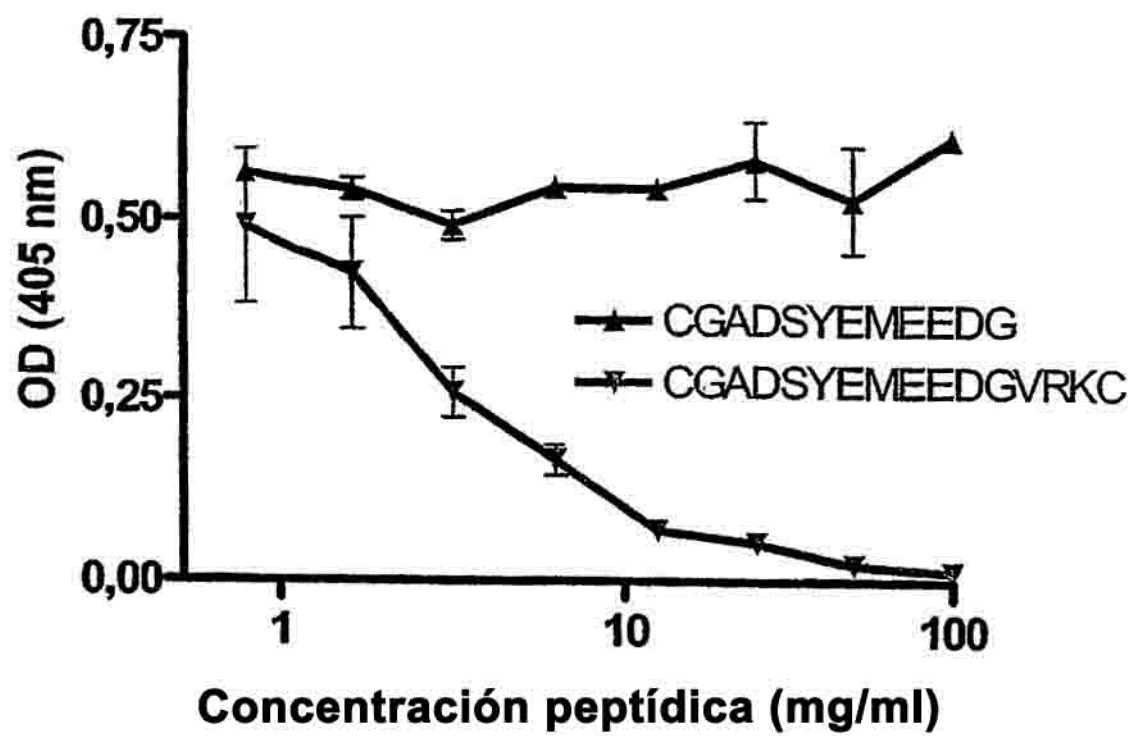
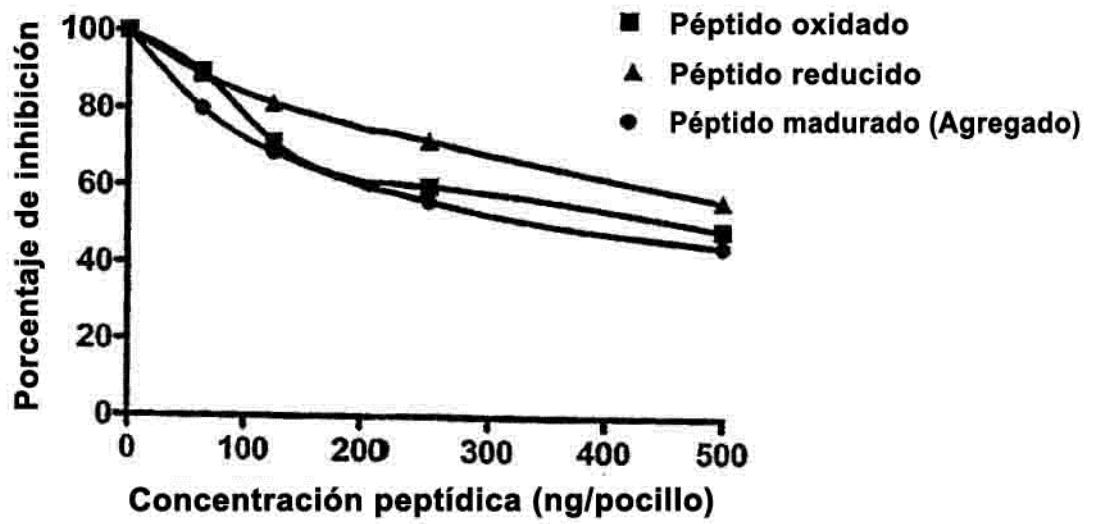


Fig. 3B

A



B

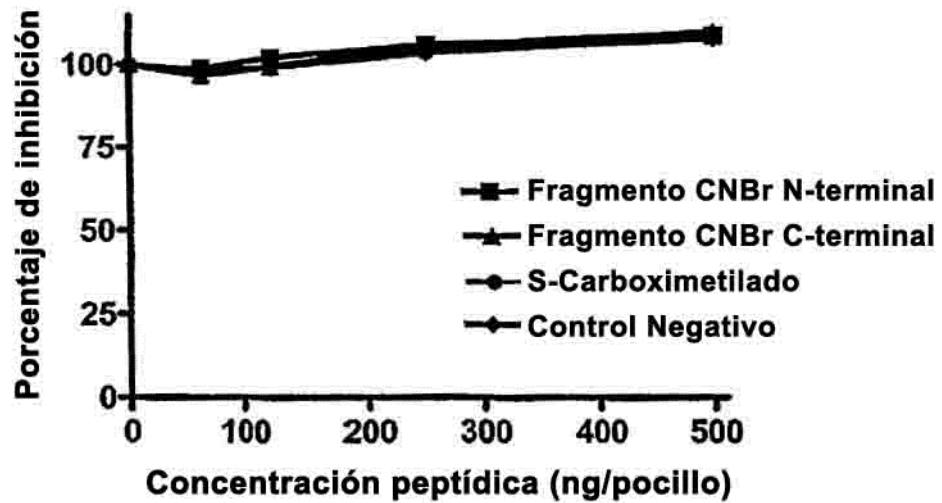
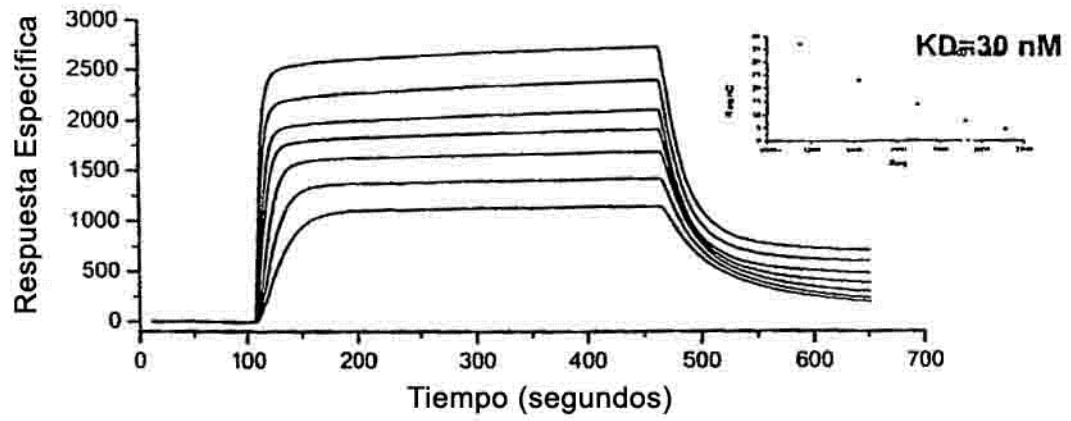


FIG. 4

A



B

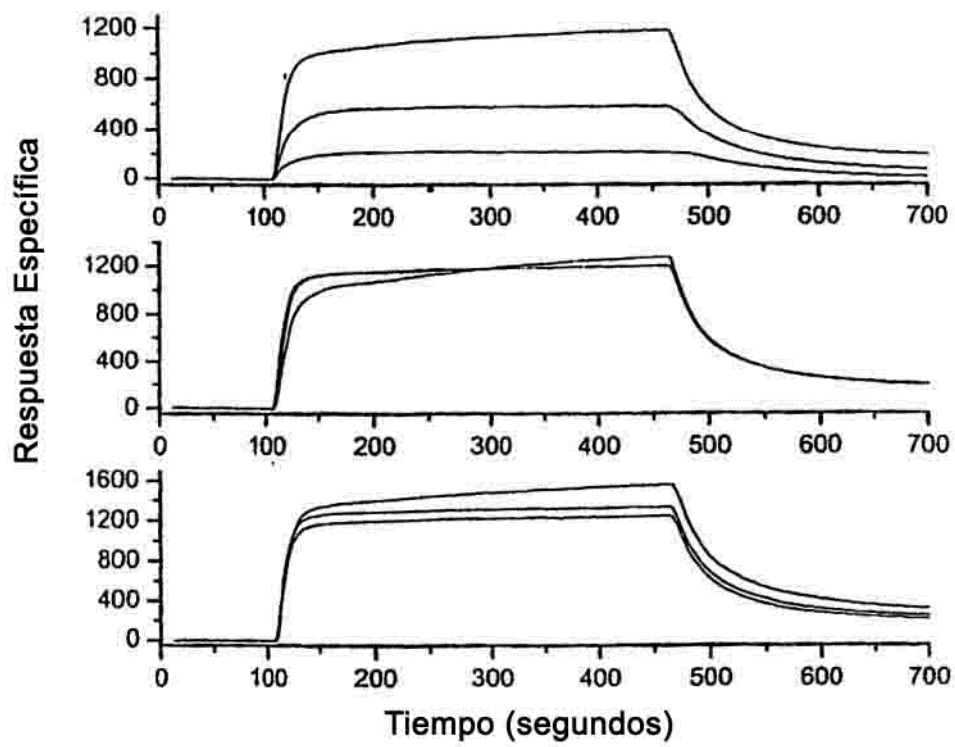


FIG. 5.

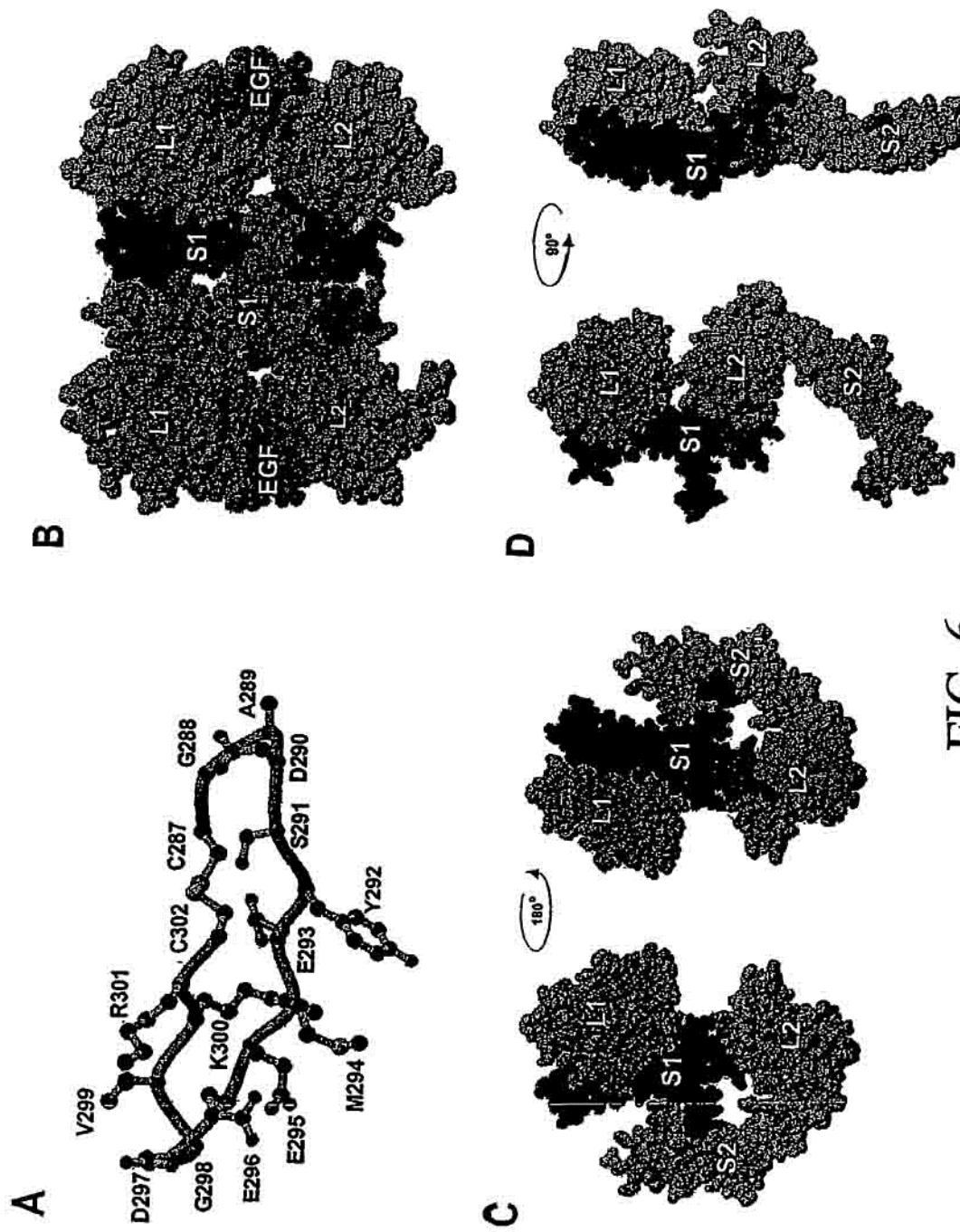
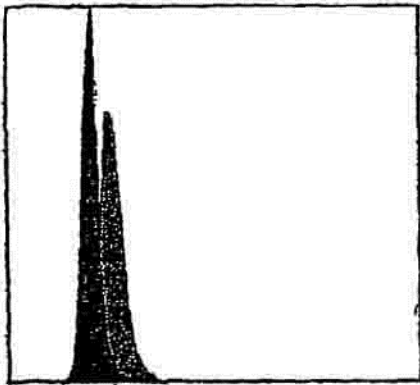
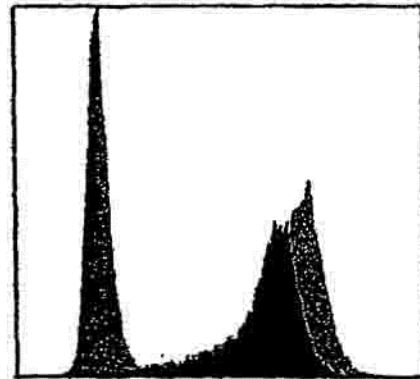


FIG. 6

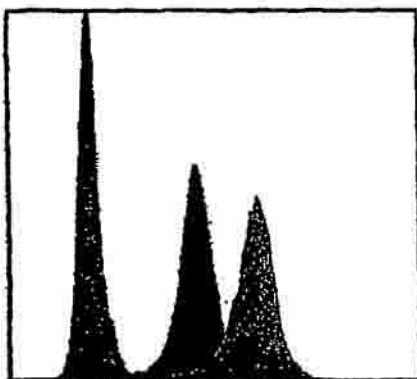
Células Parentales



de2-7 EGFR



**Bucle S1 Eliminado
(Clon 1)**



**Bucle S1 Eliminado
(Clon 2)**

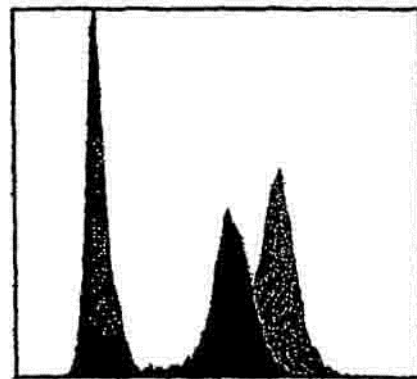
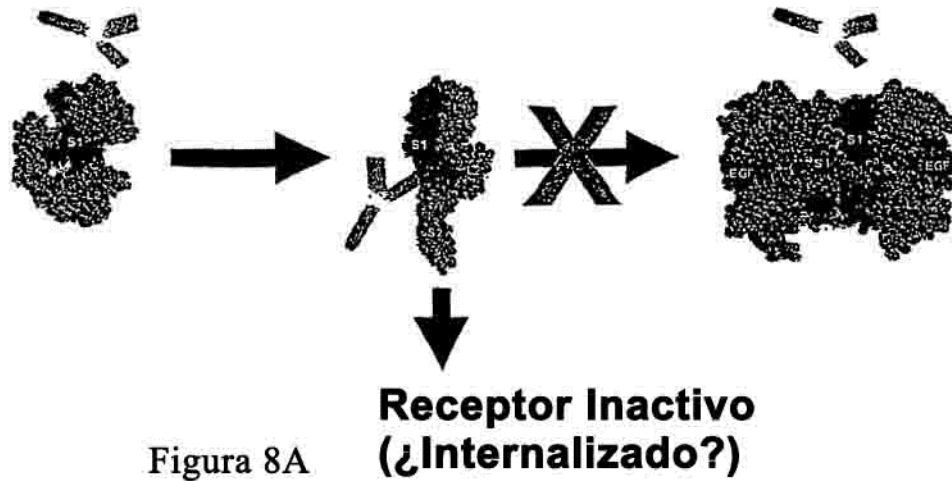


Fig. 7

A



B

**Homología del epítipo mAb 806 entre
miembros ErbB**

CGADSYEMEEDGVRKC	ErbB1
CPPDKMEVDKNGLKMC	ErbB3
CPSSKMEVEENGKMC	ErbB4

FIG. 8

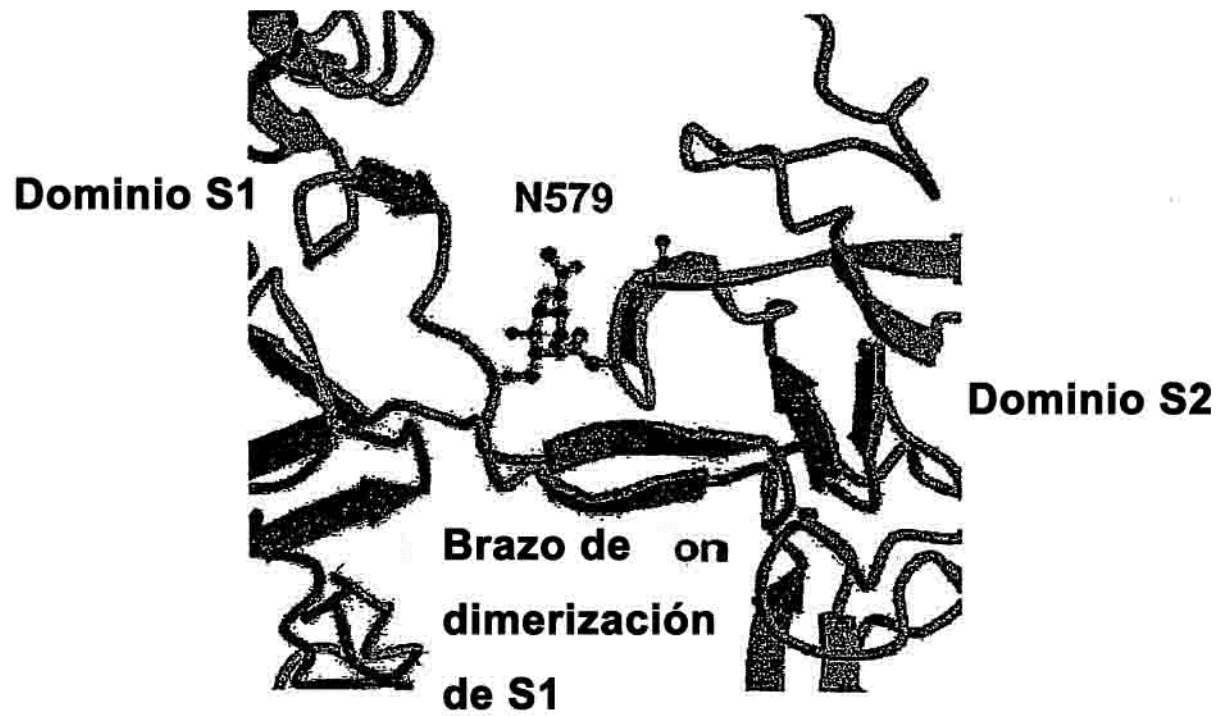


Fig. 8C

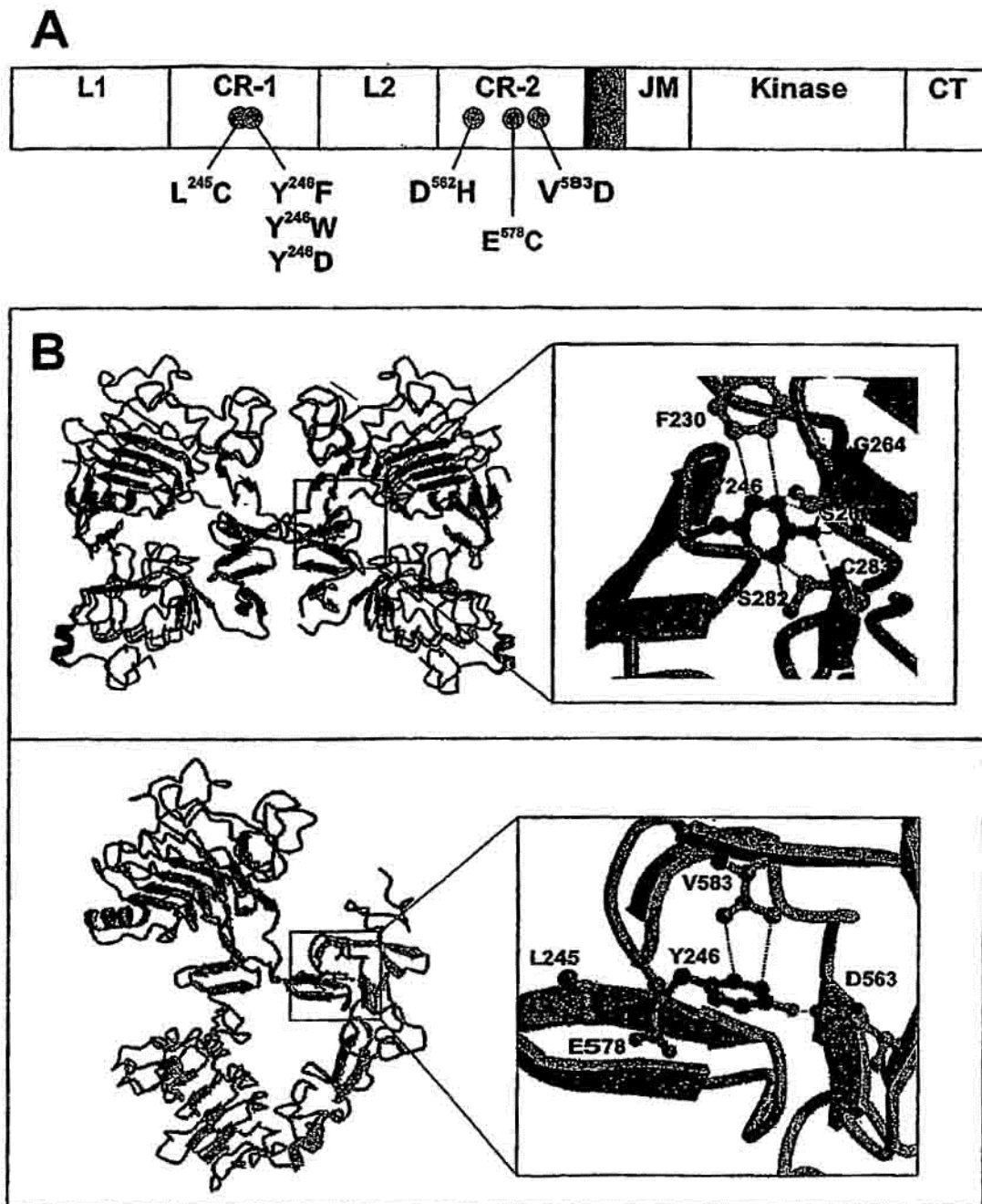


FIG. 9

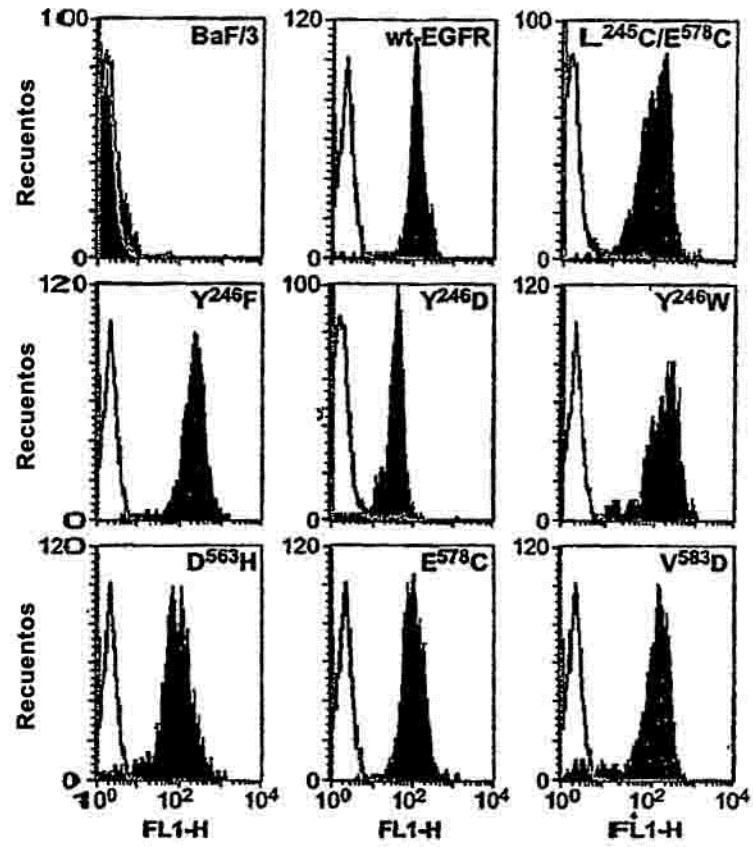


FIG. 10

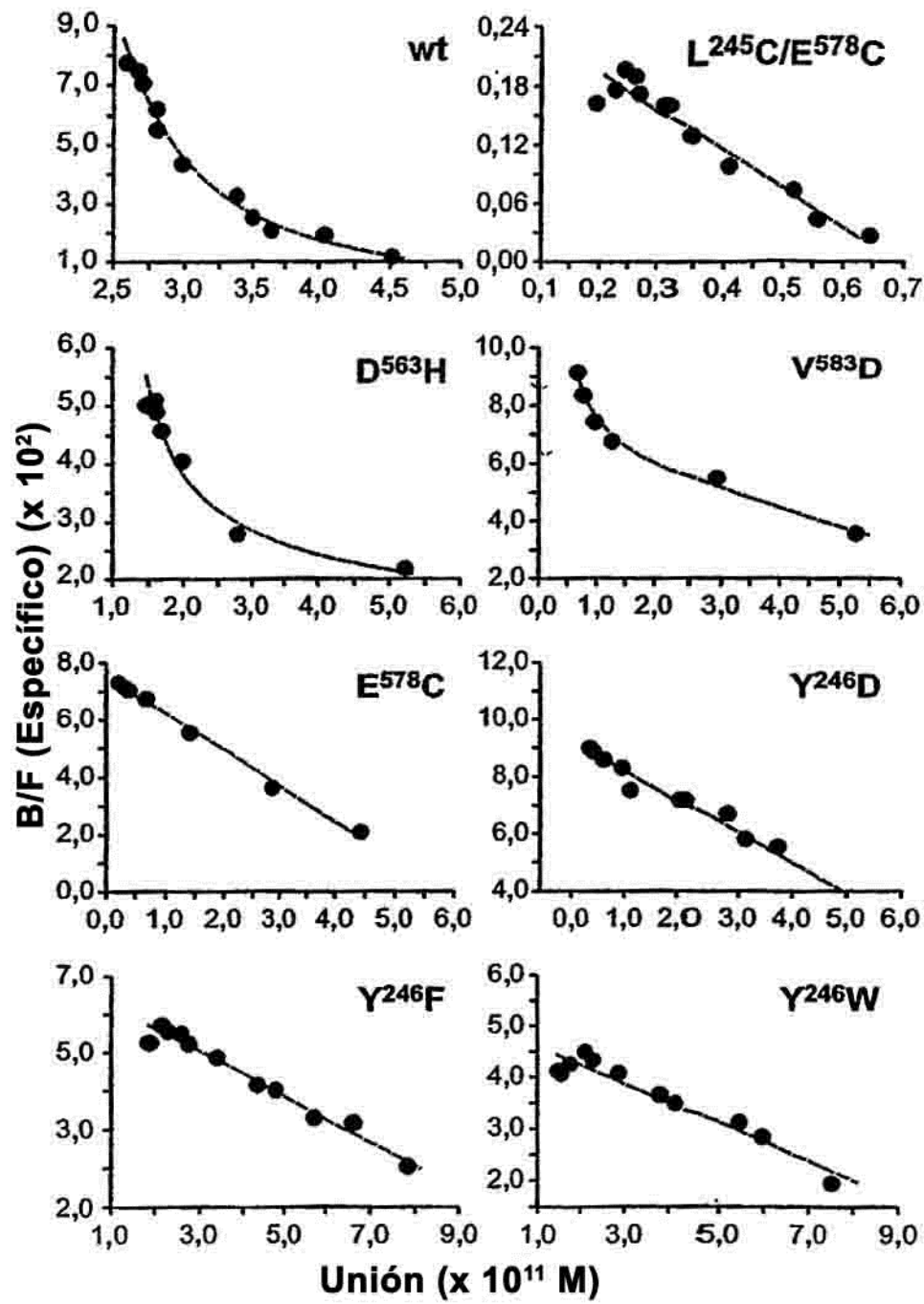


FIG. 11

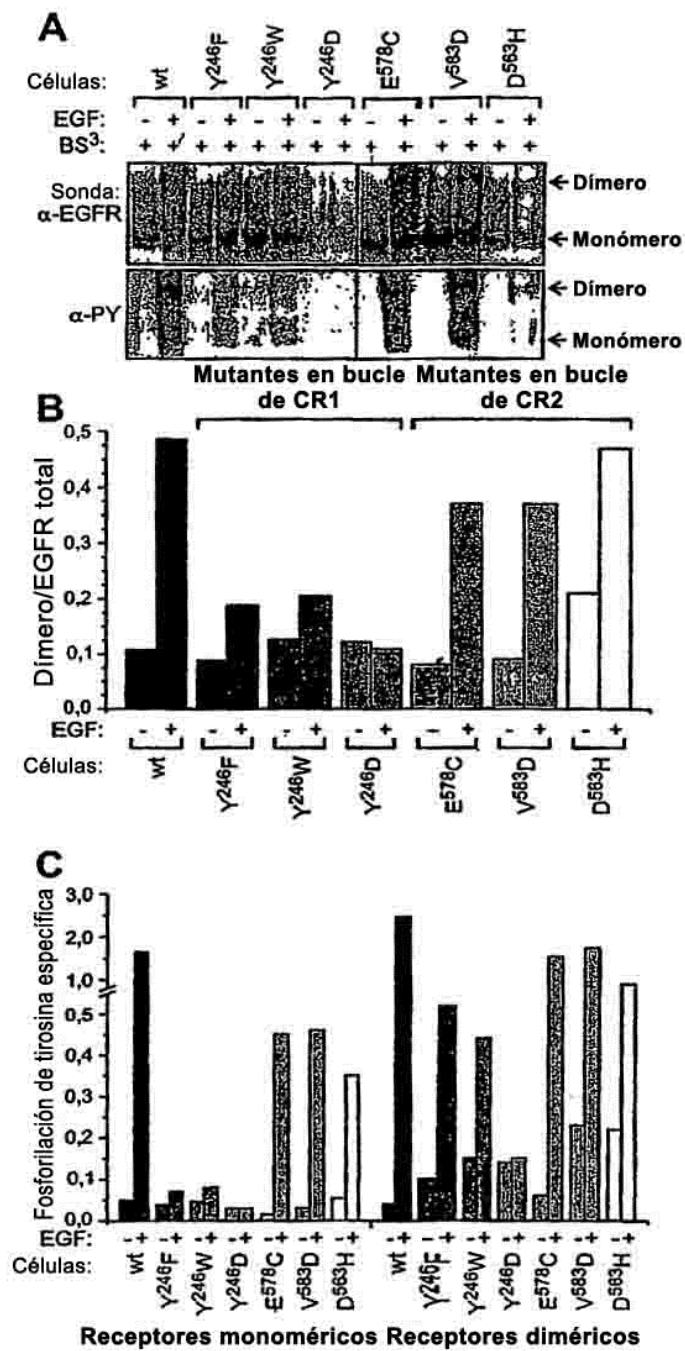


FIG. 12

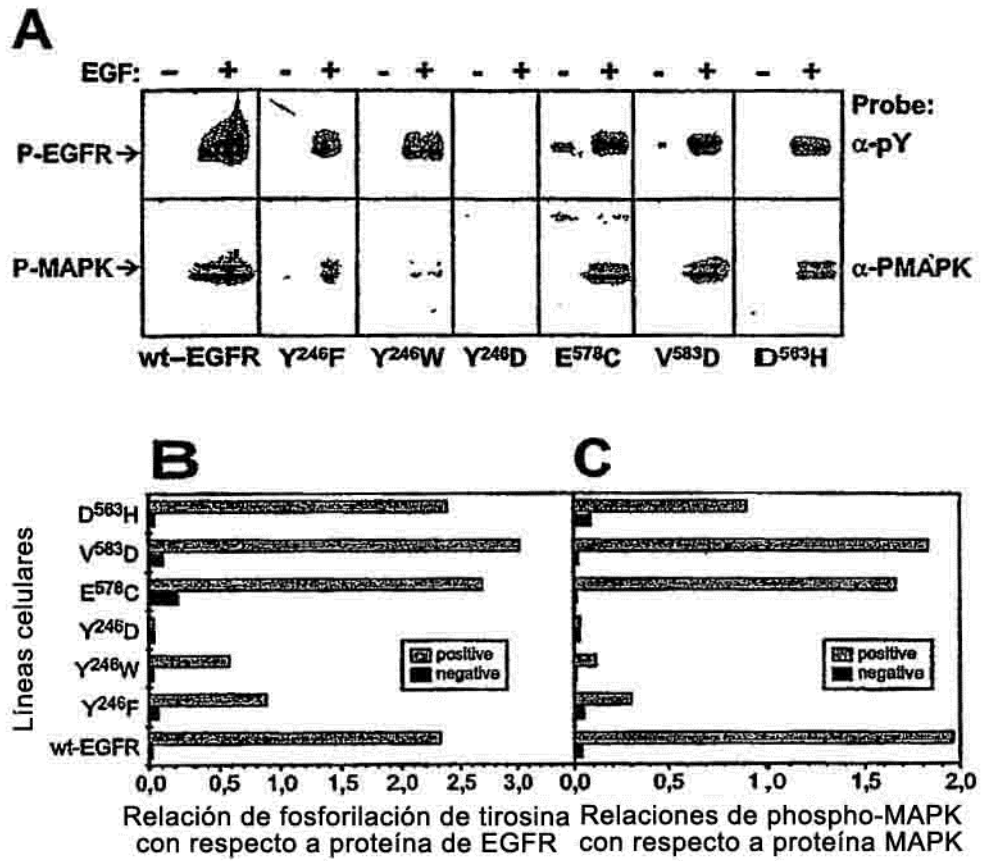


FIG. 13

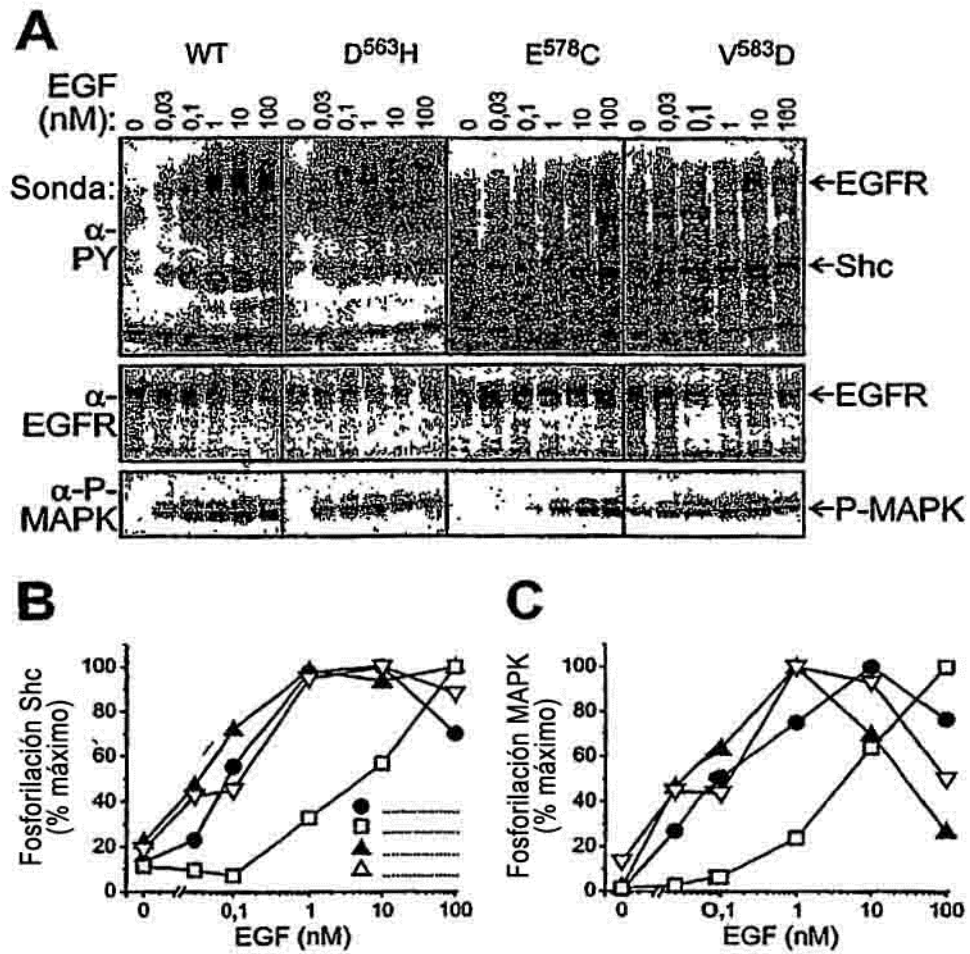


FIG. 14

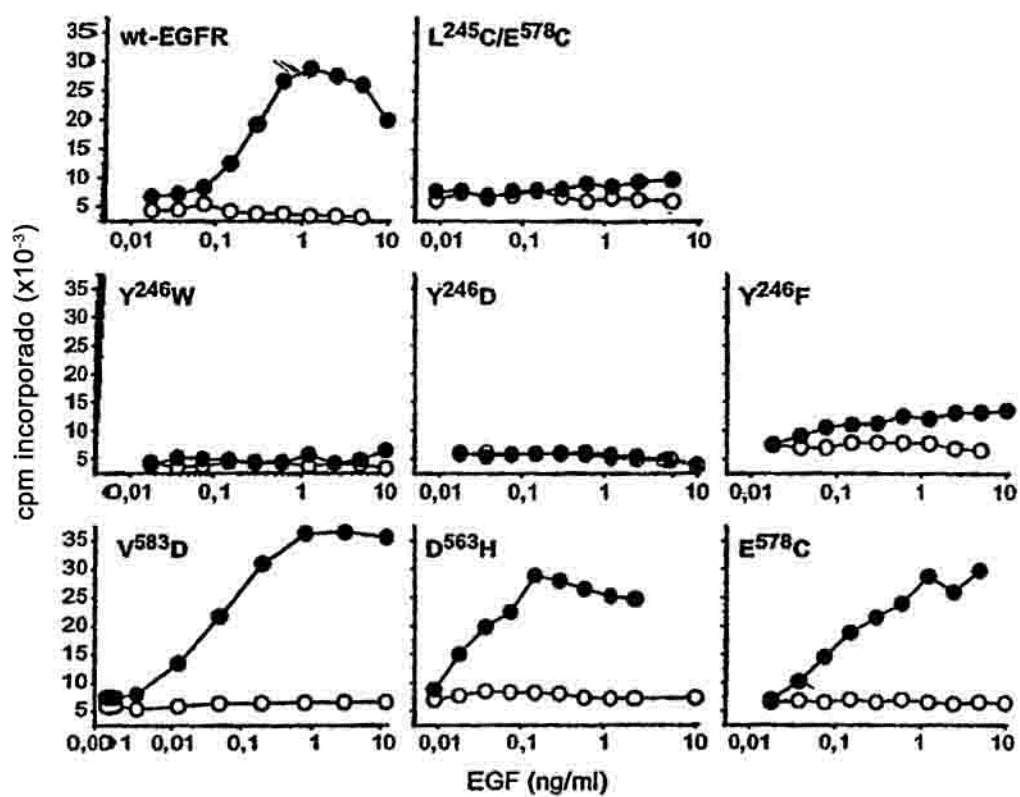


FIG. 15

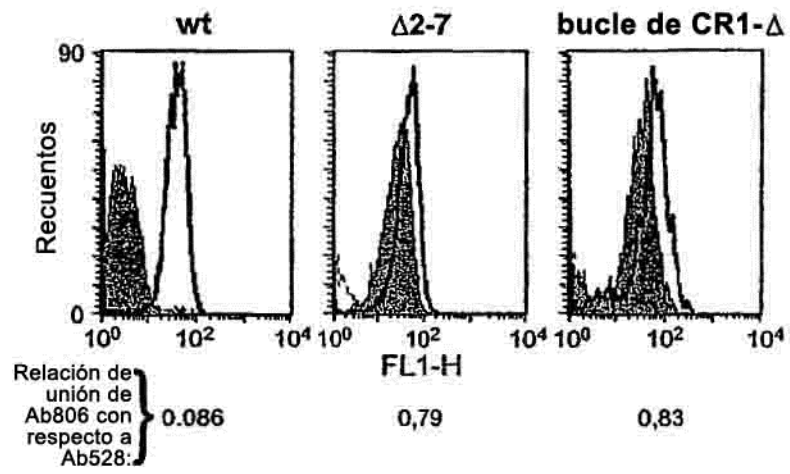


Fig. 16

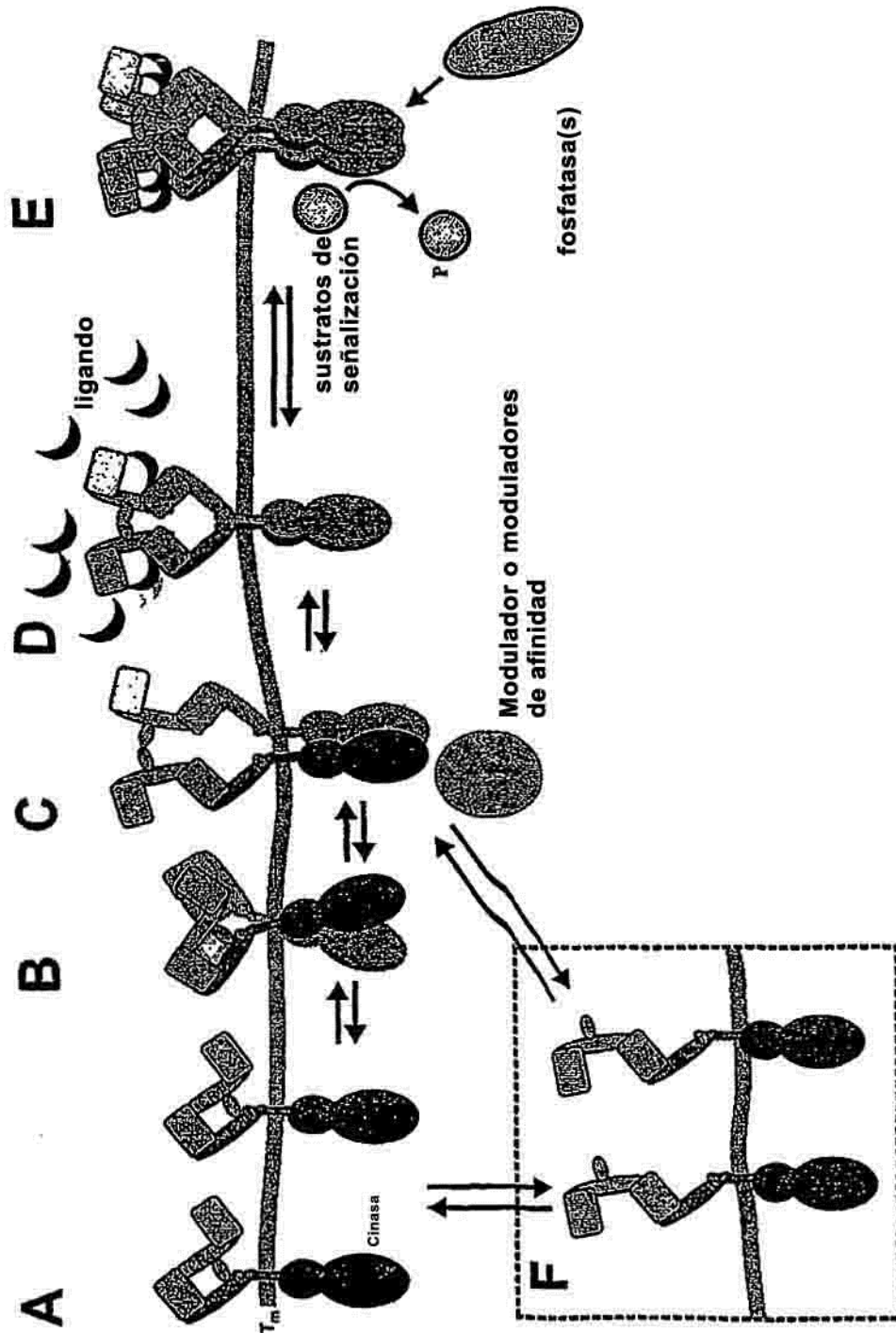


FIG. 17

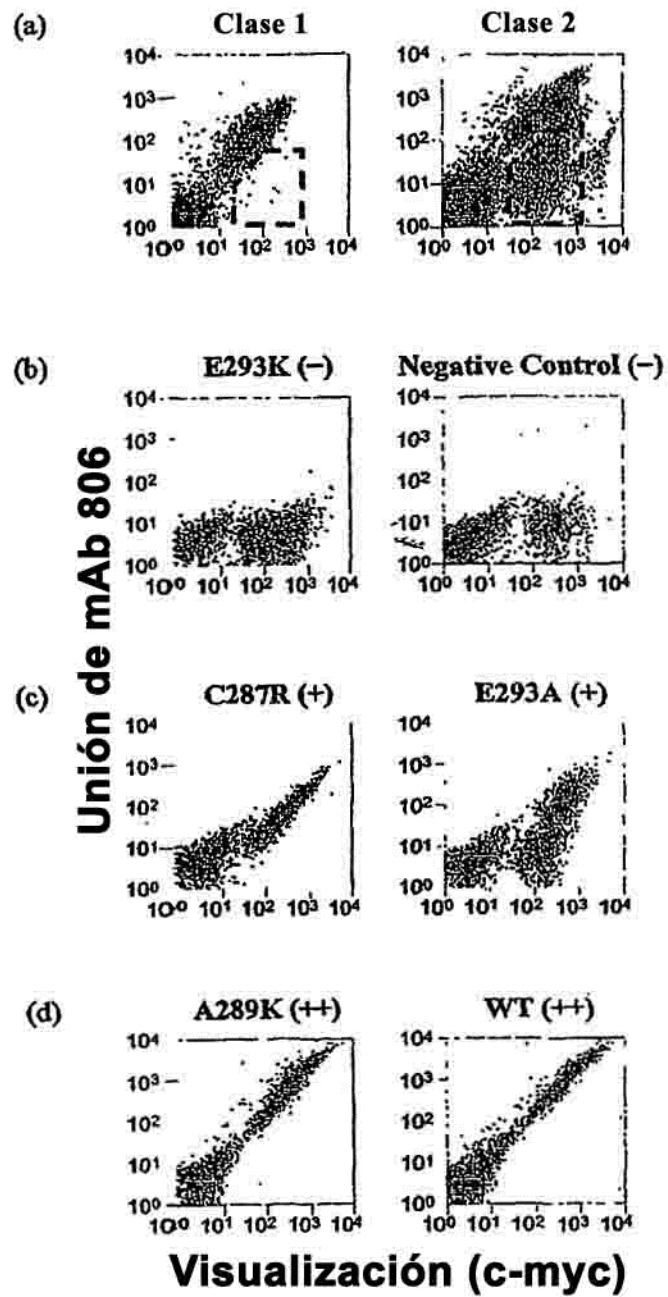


FIG. 18

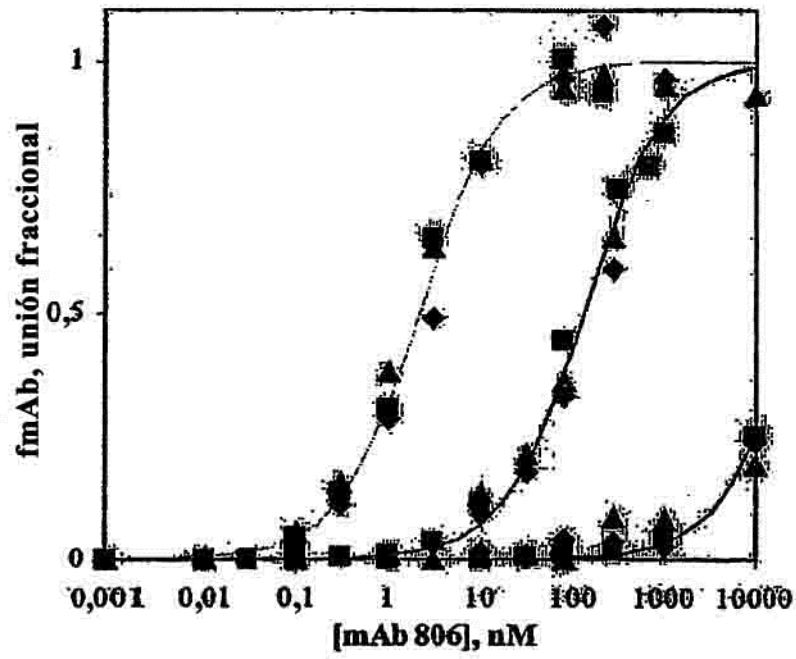


FIG. 19

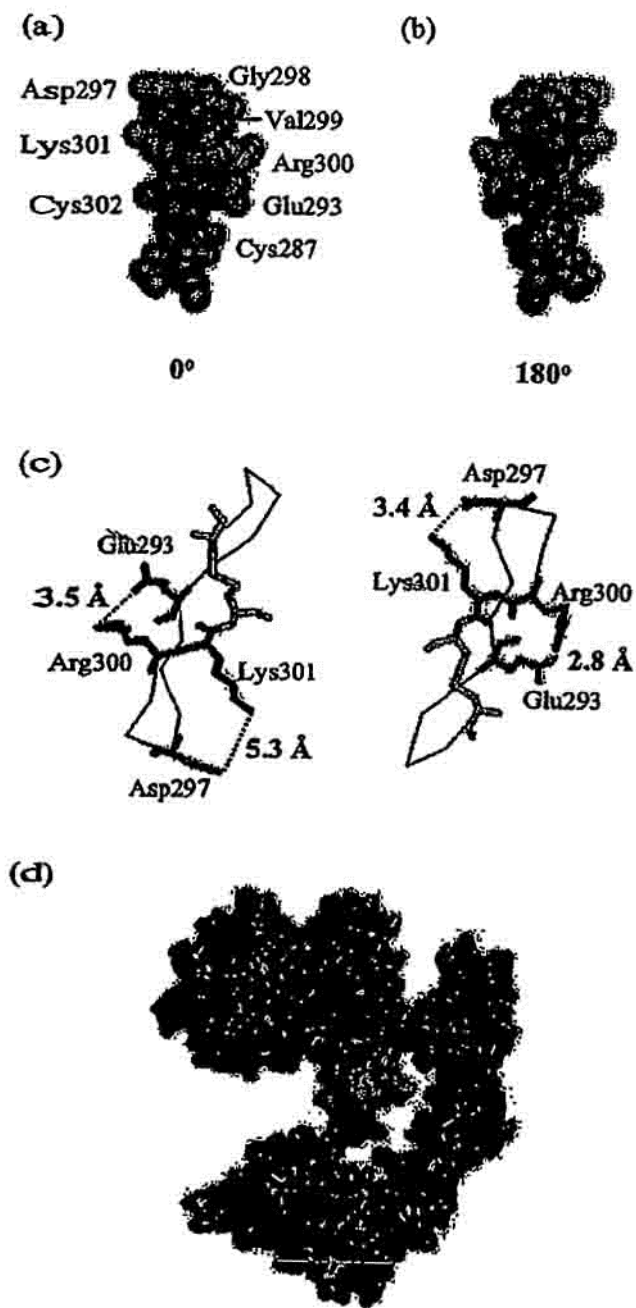


FIG. 20