

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 802**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2010 E 10704485 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2015 EP 2398828**

54 Título: **Proteínas de unión específica y uso de las mismas**

30 Prioridad:

18.02.2009 US 388504

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.07.2015

73 Titular/es:

**LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH
LTD (100.0%)
Stadelhoferstrasse 22
8001 Zürich, CH**

72 Inventor/es:

**OLD, LLOYD J.;
JONHS, TERRANCE GRANT;
PANOUSIS, CON;
SCOTT, ANDREW MARK;
RENNER, CHRISTOPH;
RITTER, GERD;
JUNGBLUTH, ACHIM;
STOCKERT, ELIZABETH;
COLLINS, PETER;
CAVENEY, WEBSTER K.;
HUANG, HUEI-JEN SU;
BURGESS, ANTONY WILKS;
NICE, EDOUARD COLLINS;
MURRAY, ANNE y
MARK, GEORGE**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 540 802 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

Proteínas de unión específica y uso de las mismas

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a miembros de unión específica, es decir anticuerpos y sus fragmentos, que se unen al receptor del factor de crecimiento epidérmico amplificado (EGFR) y a la delección en el marco de los exones 2 a 7 de EGFR, dando lugar a un receptor de EGFR truncado que carece de 267 aminoácidos del dominio extracelular (EGFR de2-7). En particular, el epítipo reconocido por los miembros de unión específica, es decir anticuerpos y sus fragmentos, está aumentado o es evidente tras la modificación post-traducciona aberrante. Estos miembros de unión específica son útiles en el diagnóstico y el tratamiento del cáncer. Los miembros de unión de la presente invención también se pueden utilizar en terapia combinados con agentes quimioterapéuticos o anticancerosos y/o con otros anticuerpos o sus fragmentos.

15 ANTECEDENTES DE LA TECNOLOGÍA RELACIONADA

[0002] El tratamiento de enfermedades proliferativas, concretamente el cáncer, mediante métodos quimioterapéuticos a menudo depende de la explotación de las diferencias en las células diana en proliferación y otras células normales del organismo humano o animal. Por ejemplo, se diseñan muchos agentes químicos para ser absorbidos por el ADN replicante rápido, de manera que el proceso de replicación del ADN y de división celular se interrumpa. Otro enfoque consiste en identificar antígenos sobre la superficie de las células tumorales u otras células anómalas que no son expresados normalmente en el tejido humano desarrollado, tales como los antígenos tumorales o antígenos embrionarios. Dichos antígenos pueden ser localizados con proteínas de unión, tales como anticuerpos que pueden bloquear o neutralizar el antígeno. Además, las proteínas de unión, incluyendo los anticuerpos y sus fragmentos, pueden liberar un agente tóxico u otra sustancia que sea capaz de activar directa o indirectamente un agente tóxico en el sitio de un tumor.

[0003] El EGFR es una diana atractiva para la terapia con anticuerpos dirigida a tumores debido a que se sobreexpresa en muchos tipos de tumores epiteliales (Voldborg et al. (1997). Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol.* 8, 1197-206; den Eynde, B. y Scott, A. M. Tumor Antigens. In: P. J. Delves y I. M. Roitt (eds.), *Encyclopedia of Immunology*, Segunda Edición, pág. 2424-31. London: Academic Press (1998)). Además, la expresión del EGFR está asociada con una prognosis pobre en numerosos tipos de tumores incluyendo de estómago, de colon, de vejiga urinaria, de mama, de próstata, de endometrio, de riñón y de cerebro (por ejemplo, glioma). Por consiguiente, se han descrito numerosos anticuerpos para EGFR en la literatura con varias evaluaciones clínicas en marcha (Baselga et al. (2000) Phase I Studies of Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Chimeric Antibody C225 Alone and in Combination With Cisplatin. *J. Clin. Oncol.* 18, 904; Faillot et al. (1996): A phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas. *Neurosurgery.* 39, 478-83; Seymour, L. (1999) Novel anticancer agents in development: exciting prospects and new challenges. *Cancer Treat. Rev.* 25, 301-12)).

[0004] Los resultados de los estudios en los que se utilizan mAb para EGFR en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón de células escamosas, gliomas cerebrales y astrocitomas malignos han sido esperanzadores. La actividad antitumoral de la mayoría de los anticuerpos para EGFR es potenciada por su capacidad para bloquear la unión al ligando (Sturgis et al. (1994) Effects of anti-epidermal growth factor receptor antibody 528 on the proliferation and differentiation of head and neck cancer. *Otolaryngol. Head Neck. Surg.* 111, 633-43; Goldstein et al. (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). Dichos anticuerpos pueden mediar su eficacia a través tanto de la modulación de la proliferación celular como de las funciones inmunitarias dependientes de los anticuerpos (por ejemplo, activación del complemento). El uso de estos anticuerpos, no obstante, puede estar limitado por la absorción en órganos que tienen niveles endógenos elevados de EGFR, tales como el hígado y la piel (Baselga et al., 2000; Faillot et al., 1996).

[0005] Una proparte significativa de tumores que contienen amplificaciones del gen de EGFR (es decir, múltiples copias del gen de EGFR) también expresan simultáneamente una versión truncada del receptor (Wikstrand et al. (1998) The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFR): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. *J. Neurovirol.* 4, 148-158) conocida como EGFR de2-7, ΔEGFR, o Δ2-7 (términos utilizados aquí indistintamente) (Olapade-Olaopa et al. (2000) Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. *Br. J. Cancer.* 82, 186-94)). El reordenamiento observado en EGFR de2-7 da como resultado un ARNm maduro en el marco que carece de 801 nucleótidos que abarcan los exones 2-7 (Wong et al. (1992) Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 89, 2965-9; Yamazaki et al. (1990) A deletion mutation within the ligand binding domain is responsible for activation of epidermal growth factor receptor gene in human brain tumors. *Jpn. J. Cancer Res.* 81, 773-9; Yamazaki et al. (1988) Amplification of the structurally and functionally altered epidermal growth factor receptor gene (c-erbB) in human brain tumors. *Mol. Cell Biol.* 8, 1816-20; Sugawa et al. (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)). La correspondiente proteína EGFR tiene una delección de 267 aminoácidos que comprende los residuos 6-273 del dominio extracelular y un residuo de glicina nuevo en la confluencia de la fusión (Sugawa et al., 1990). Esta delección, junto con la inserción de un residuo glicina, produce un péptido de empalme único en la interfaz de la delección (Sugawa et al., 1990).

[0006] Se ha descrito EGFR de2-7 en numerosos tipos de tumores incluyendo glioma, mama, pulmón, ovárico y próstata (Wikstrand et al. (1997) Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII. *Cancer Res.* 57, 4130-40; Olapade-Olaopa et al. (2000) Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer. *Br. J. Cancer.* 82, 186-94; Wikstrand, et al. (1995) Monoclonal antibodies against EGFRvIII in are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas. *Cancer Res.* 55, 3140-8; Garcia de Palazzo et al. (1993) Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res.* 53, 3217-20)). Aunque este receptor truncado no se une al ligando, posee poca actividad constitutiva y confiere una ventaja de crecimiento significativa a las células de glioma desarrolladas como xenoinjertos tumorales en ratones desnudos (Nishikawa et al. (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 7727-31) y es capaz de transformar células NIH3T3 (Batra et al. (1995) Epidermal growth factor ligand independent, unregulated, cell-transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene. *Cell Growth Differ.* 6, 1251-9) y células MCF-7. Los mecanismos celulares utilizados por EGFR de2-7 en células de glioma no están completamente definidos pero se ha descrito que incluyen una disminución de la apoptosis (Nagane et al. (1996) A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. *Cancer Res.* 56, 5079-86) y un pequeño aumento de la proliferación (Nagane et al. 1996).

[0007] Como la expresión de este receptor truncado está restringida a las células tumorales, representa una diana altamente específica para la terapia con anticuerpos. Por consiguiente, numerosos laboratorios han informado sobre la generación de anticuerpos tanto policlonales (Humphrey et al. (1990) Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 4207-11) como monoclonales (Wikstrand et al. (1995) Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas; Okamoto et al. (1996) Monoclonal antibody against the fusion junction of a deletion-mutant epidermal growth factor receptor. *Br. J. Cancer.* 73, 1366-72; Hills et al. (1995) Specific targeting of a mutant, activated EGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody. *Int. J. Cancer.* 63, 537-43) específicos para el único péptido de EGFR de2-7. Una serie de mAb de ratón, aislados después de la inmunización con el péptido de2-7 único, mostraron selectividad y especificidad para el receptor truncado y reconocieron los xenoinjertos EGFR de2-7 positivos desarrollados en ratones desnudos (Wikstrand et al. (1995); Reist et al. (1997) Improved targeting of an anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody in tumor xenografts after labeling using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. *Cancer Res.* 57, 1510-5; Reist et al. (1995) Tumor-specific anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibodies: use of the tyramine-cellobiose radioiodination method enhances cellular retention and uptake in tumor xenografts. *Cancer Res.* 55, 4375-82).

[0008] No obstante, un defecto potencial de los anticuerpos para EGFR de2-7 es que solamente una proparte de tumores que muestran amplificación del gen de EGFR también expresan EGFR de2-7 (Ekstrand et al. (1992) Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N-and/or C-terminal tails. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 89, 4309-13)). El porcentaje exacto de tumores que contienen EGFR de2-7 no está completamente establecido, debido a que el uso de técnicas diferentes (es decir PCR frente inmunohistoquímica) y diferentes anticuerpos, ha producido una amplia intervalo de valores referidos para la frecuencia de su presencia. Los datos publicados indican que aproximadamente 25-30% de los gliomas expresan EGFR de2-7 siendo la expresión más baja en astrocitomas anaplásicos y la más alta en glioblastoma multiforme (Wong et al. (1992); Wikstrand et al. (1998) The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFR): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. *J. Neurovirol.* 4, 148-58; Moscatello et al. (1995) Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res.* 55, 5536-9). Se ha descrito que la proparte de células positivas en los gliomas que expresan EGFR de2-7 oscila entre 37-86% (Wikstrand et al., 1997). Se encontró que un 27% de los carcinomas de mama y un 17% de los cánceres de pulmón eran positivos para EGFR de2-7 (Wikstrand et al., (1997); Wikstrand et al., (1995); Wikstrand et al., (1998) y Hills et al., 1995). De este modo, cabría esperar que los anticuerpos específicos para EGFR de2-7 fueran útiles solamente en un porcentaje de tumores positivos para EGFR.

[0009] De este modo, si bien la evidencia existente de actividad de los anticuerpos para EGFR es esperanzadora, continúan las limitaciones observadas sobre la gama de aplicabilidad y eficacia reflejadas anteriormente. Por consiguiente, sería deseable desarrollar anticuerpos y agentes similares que demuestren eficacia con una amplia gama de tumores, y es a la consecución de ese objetivo a la que está dirigida la presente invención.

[0010] La mención de referencias en el presente documento no se interpretará como la admisión de que son antecedentes de la presente invención.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

- 5 [0011] En base a la descripción contenida en el presente documento, la presente invención proporciona un anticuerpo contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), en el que dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 164 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 166.
- 10 [0012] En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un kit que comprende un anticuerpo aislado de la presente invención para el diagnóstico de un tumor en que el EGFR se expresa de forma aberrante o EGFR se expresa en forma de una proteína truncada.
- 15 [0013] En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo aislado de la presente invención.
- [0014] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo aislado de la presente invención para usar en la prevención y/o el tratamiento de cáncer en mamíferos.
- 20 [0015] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un huésped unicelular transformado con una molécula de ADN recombinante que codifica un anticuerpo aislado de la presente invención.
- [0016] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un inmunocombinado que comprende un agente citotóxico y un anticuerpo aislado de la presente invención.
- 25 [0017] La presente invención y las realizaciones de la misma se establecen en las reivindicaciones adjuntas.
- [0018] La presente invención proporciona miembros de unión específica aislados, es decir anticuerpos o sus fragmentos, que reconocen un epítipo de EGFR que no muestra ninguna alteración o sustitución en la secuencia de aminoácidos con respecto al EGFR de tipo salvaje y que se encuentra en células tumorígenicas, hiperproliferativas o anormales y no es detectable normalmente en células normales o de tipo salvaje (el término "célula de tipo salvaje" Tal como se utiliza en el presente documento contempla una célula que expresa EGFR endógeno, pero no 2-7 EGFR y el término excluye específicamente una célula que expresa en exceso el gen de EGFR; el término "tipo salvaje" hace referencia a un genotipo o fenotipo u otra característica presente en una célula normal en lugar de en una célula anormal o tumorígenica). En un aspecto adicional, la presente invención proporciona miembros de unión específica, es decir anticuerpos o sus fragmentos, que reconocen un epítipo de EGFR que se encuentra en las células tumorígenicas, hiperproliferativas o anormales y no es detectable normalmente en células normales o de tipo salvaje, donde el epítipo está aumentado o es evidente tras la modificación post-traducciona aberrante o la expresión aberrante. En una ilustración no limitante concreta proporcionada en el presente documento, el epítipo de EGFR está aumentado o resulta evidente en el que la modificación post-traducciona no es completa o total hasta el punto observado en la expresión normal de EGFR en las células de tipo salvaje. En una realización, el epítipo de EGFR está aumentado o resulta evidente tras la modificación de carbohidratos inicial o simple o la glicosilación temprana, concretamente la modificación con alto contenido de manosa, y está reducido o no resulta evidente en presencia de una modificación de carbohidratos compleja.
- 45 [0019] Los miembros de unión específica, es decir anticuerpos o sus fragmentos, tal como sus fragmentos inmunogénicos, no se une a ni reconoce células de tipo salvaje o normales que contienen un epítipo de EGFR de tipo salvaje o normal en ausencia de expresión aberrante y en presencia de una modificación post-traducciona de EGFR normal.
- 50 [0020] Más concretamente, el miembro de unión específica de la invención, es decir anticuerpos o sus fragmentos, reconoce un epítipo de EGFR que está presente en células que expresan EGFR en exceso (por ejemplo el gen de EGFR está amplificado) o que expresan EGFR de2-7, concretamente en presencia de una modificación post-traducciona aberrante, y que no es detectable normalmente en células que expresan EGFR en condiciones normales, concretamente en presencia de una modificación post-traducciona normal.
- 55 [0021] Los presentes inventores han descubierto nuevos anticuerpos monoclonales novedosos, ilustrados en el presente documento por los anticuerpo denominados mAb 806, ch806, hu806, mAb175, mAb124 y mAb1133, que reconocen específicamente EFGR expresado aberrantemente. En particular, los anticuerpos de la presente invención reconocen un epítipo de EGFR que se encuentra en células tumorígenicas, hiperproliferativas o anormales y no es detectable normalmente en células normales o de tipo salvaje, donde el epítipo está aumentado o resulta evidente tras la modificación post-traducciona aberrante. Los anticuerpos nuevos de la presente invención también reconocen EGFR de tipo salvaje amplificado y de2-7EGFR, pero se unen a un epítipo distinto del péptido de empalme único de la mutación EGFR de2-7. Los anticuerpos de la presente invención reconocen específicamente el EGFR expresado aberrantemente, incluyendo el EGFR amplificado o EGFR mutante (ilustrado en el presente documento por la mutación de2-7), concretamente tras la modificación post-traducciona aberrante. Adicionalmente, aunque estos anticuerpos no reconocen el EGFR cuando es expresado sobre la superficie de la
- 60
- 65

célula de una línea celular de glioma que expresa cantidades normales de EGFR, no se unen al dominio extracelular del EGFR (sEGFR) inmovilizado sobre la superficie de placas ELISA, indicando el reconocimiento de un epítipo conformacional. Estos anticuerpos se unen a la superficie de las células A431, que tienen una amplificación del gen de EGFR pero no expresan EGFR de2-7. De manera destacada, estos anticuerpos no se unían significativamente a tejidos normales, tales como hígado y piel, que expresan niveles de EGFR de tipo salvaje (wt) endógeno que son mayores que en la mayoría de otros tejidos normales, pero donde EGFR no está expresado aberrantemente o amplificado.

[0022] Los anticuerpos de la presente invención pueden clasificar específicamente la naturaleza de los tumores o células tumorigénicas con EGFR, tiñendo o reconociendo de otro modo aquellos tumores o células en los que se encuentra presente la expresión de EGFR aberrante, incluyendo la amplificación de EGFR y/o la mutación de EGFR, concretamente de2-7EGFR. Adicionalmente, los anticuerpos de la presente invención demuestran una actividad anti-tumoral *in vivo* significativa frente a tumores que contienen EGFR amplificado y contra xenoinjertos EGFR de2-7 positivos.

[0023] La especificidad única de estos anticuerpos para unirse a EGFR de2-7 y EGFR amplificado pero no al EGFR normal de tipo salvaje proporciona usos diagnósticos y terapéuticos para identificar, caracterizar y reconocer numerosos tipos de tumores, por ejemplo, tumores de cabeza y cuello, mama, o próstata y glioma, sin los problemas asociados con la absorción en tejido normal que se puede observar con los anticuerpos de EGFR conocidos previamente.

[0024] Por consiguiente, la invención proporciona proteínas de unión específica, es decir anticuerpos, que se unen a EGFR de2-7 en un epítipo que es distinto del péptido de empalme, pero que no se unen a EGFR en células normales en ausencia de amplificación del gen de EGFR. Por amplificación, se quiere significar que la célula comprende múltiples copias del gen de EGFR.

[0025] Preferiblemente, el epítipo reconocido por los anticuerpos de la invención está localizado en la región que comprende los residuos 273-501 de la secuencia de EGFR normal o de tipo salvaje madura, y preferiblemente comprende los residuos 287-302 (SEQ ID NO: 14) de la secuencia de EGFR normal o de tipo salvaje madura. Por lo tanto, se proporcionan también proteínas de unión específica, es decir anticuerpos, que se unen a EGFR de2-7 en un epítipo localizado en la región que comprende los residuos 273-501 y/o 287-302 (SEQ ID NO: 14) de la secuencia de EGFR. El epítipo puede determinarse mediante cualquiera de las técnicas de mapeo epitópico convencionales conocidas por los expertos en la técnica. Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica los residuos 273-501 y/o 287-302 (SEQ ID NO: 14) podría digerirse, y los fragmentos resultantes expresarse en un huésped adecuado. La unión al anticuerpo podría determinarse como se ha mencionado antes.

[0026] Los anticuerpos son aquellos que tienen las características de los anticuerpos que han identificado y caracterizado los inventores, en particular que reconocen el EGFR expresado aberrantemente, como se encuentra en el EGFR amplificado y el de2-7EGFR.

[0027] En otro caso, la descripción proporciona anticuerpos capaces de competir con los anticuerpos de la invención, en condiciones en las que se bloquea la unión de al menos un 10% de un anticuerpo que tiene las secuencias de cadena VH y VL de los anticuerpos de la invención a de2-7EGFR por competición con dicho anticuerpo en un análisis ELISA. En particular, se contemplan anticuerpos anti-idiotípicos y se ilustran en el presente documento. Los anticuerpos anti-idiotípicos LMH-11, LMH-12 y LMH-13 se proporcionan en el presente documento.

[0028] La unión de un anticuerpo a su antígeno diana está mediada por las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de sus cadenas pesadas y ligeras, siendo el papel de la CDR3 de particular importancia. Por consiguiente, los miembros de unión específica basados en las regiones CDR3 de la cadena pesada o ligera, y preferiblemente ambas, de los anticuerpos de la invención serán miembros de unión específica útiles para la terapia *in vivo*.

[0029] Por consiguiente, las proteínas de unión específica, tales como anticuerpos que están basados en las CDR de los anticuerpos de la invención identificados, particularmente las regiones CDR3, serán útiles para reconocer tumores con EGFR amplificado independientemente de su estado EGFR de2-7. Dado que los anticuerpos de la invención no se unían significativamente al receptor normal de tipo salvaje, no habría una absorción significativa en tejido normal, una limitación de los anticuerpos contra EGFR que están siendo desarrollados en la actualidad.

[0030] Se proporciona un anticuerpo aislado capaz de unirse a EGFR en tumores que contienen amplificaciones del gen de EGFR, en el que las células de los tumores contienen múltiples copias del gen de EGFR y en tumores que expresan la versión truncada del receptor de EGFR de2-7, en el que el anticuerpo no se une al péptido de empalme de EGFR de2-7 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, en el que el anticuerpo se une a un epítipo en la secuencia de residuos 287-302 (SEQ ID NO: 14) de EGFR de tipo salvaje humano, y en el que el anticuerpo no comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 2 y no comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 4.

- 5 [0031] En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, teniendo la cadena pesada la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 42 y teniendo la cadena ligera la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 47.
- [0032] Se proporciona un anticuerpo aislado, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la región variable de la cadena pesada comprende regiones de dominio de unión a polipéptido que tienen las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOS: 44, 45 y 46.
- 10 [0033] Se proporciona un anticuerpo aislado, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la región variable de la cadena ligera comprende regiones de dominio de unión a polipéptido que tienen las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NOS: 49, 50 y 51.
- 15 [0034] En una realización, el anticuerpo aislado es la forma de un anticuerpo F(ab')₂, fragmento scFv, diacuerpo, triacuerpo o tetracuerpo.
- [0035] En una realización, se proparte un anticuerpo aislado que comprende además un marcador detectable o funcional.
- 20 [0036] En una realización, el marcador detectable o funcional es un fármaco unido covalentemente.
- [0037] En una realización, el marcador es un radiomarcador.
- 25 [0038] En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado, en el que el anticuerpo aislado está pegilado.
- [0039] En un caso, se proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un anticuerpo aislado mencionado en este documento.
- 30 [0040] En otro caso, se proporciona un método de preparación de un anticuerpo aislado, que comprende expresar un ácido nucleico tal como se menciona anterior y posteriormente en condiciones para provocar la expresión del anticuerpo, y recuperar el anticuerpo.
- [0041] En otro caso, se proporciona un método de tratamiento de un tumor en un paciente humano que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un anticuerpo aislado mencionados en este documento.
- 35 [0042] Se proporciona un kit para el diagnóstico de un tumor en el que el EGFR se expresa aberrantemente o en el que el EGFR se expresa en forma de una proteína truncada, que comprende un anticuerpo aislado mencionado en este documento.
- 40 [0043] En una realización, el kit comprende además reactivos y/o instrucciones para el uso.
- [0044] Se proporciona una composición farmacéutica que comrende un anticuerpo aislado mencionado en este documento.
- 45 [0045] En una realización, la composición farmacéutica comprende además un vehículo, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- [0046] En una realización, la composición farmacéutica comprende además un agente contra el cáncer seleccionado del grupo que consiste en agentes quimioterapéuticos, anticuerpos anti-EGFR, agentes radioinmunoterapéuticos y combinaciones de los mismos.
- 50 [0047] En una realización, los agentes quimioterapéuticos se seleccionan del grupo que consiste en inhibidores de tirosina quinasa, inhibidores de la cascada de fosforilación, moduladores post-traduccionales, inhibidores del crecimiento o división celular (por ejemplo, antimitóticos), inhibidores de la transducción de señales y combinaciones de los mismos.
- 55 [0048] En una realización, los inhibidores de tirosina quinasa se seleccionan del grupo que consiste en AG1478, ZD1839, STI571, OSI-774, SU-6668 y combinaciones de los mismos.
- 60 [0049] En una realización, los anticuerpos anti-EGFR se seleccionan del grupo que consiste en los anticuerpos anti-EGFR 528,225, SC-03,DR8.3, L8A4, Y10, ICR62, ABX-EGF y combinaciones de los mismos.
- 65 [0050] En otro caso, se proporciona un método de prevención y/o tratamiento de cánceres en mamíferos, que comprende administrar a un mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica tal como se indica aquí.

[0051] En un caso, se proporciona un método para el tratamiento de cánceres residentes en el cerebro que producen EGFR expresado aberrantemente en mamíferos, que comprende administrar a un mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica tal como se indica aquí.

5 **[0052]** En otro caso, los cánceres residentes en el cerebro se seleccionan del grupo que consiste en glioblastomas, meduloblastomas, meningiomas, astrocitomas neoplásicos y malformaciones arteriovenosas neoplásicas.

[0053] Se proporciona un huésped unicelular transformado con una molécula de ADN recombinante que codifica un anticuerpo tal como se indica aquí.

10 **[0054]** En una realización, el huésped unicelular se selecciona del grupo que consiste en células de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, levaduras, CHO, YB/20, NSO, SP2/0, R1.1, B-W, L-M, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40 y BMT10, células vegetales, células de insectos, y células humanas en cultivo de tejidos.

15 **[0055]** En otro caso, se proporciona un método para detectar la presencia de EGFR amplificado, de2-7EGFR o EGFR con alta glicosilación de manosa, en el que el EGFR se mide mediante: (a) la puesta en contacto de una muestra biológica de un mamífero en la que se sospecha la presencia de EGFR amplificado, de2-EGFR o EGFR con alta glicosilación de manosa con un anticuerpo aislado de la reivindicación 1 en condiciones que permiten que tenga lugar la unión del EGFR con el anticuerpo aislado; y (b) la detección de si ha tenido lugar la unión entre el EGFR de la muestra y el anticuerpo aislado, en el que la detección de la unión indica la presencia o la actividad del EGFR en la muestra.

20 **[0056]** En otro caso del método de detección de la presencia de EGFR amplificado, de2-7EGFR o EGFR con alta glicosilación de manosa, la detección de la presencia de EGFR indica la existencia de un tumor de cáncer en el mamífero.

25 **[0057]** En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado capaz de unirse a EGFR en tumores que contienen amplificaciones del gen de EGFR, en el que las células de los tumores contienen múltiples copias del gen de EGFR y en tumores que expresan la versión truncada del receptor de EGFR de2-7, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, teniendo la cadena pesada la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 42 y teniendo la cadena ligera la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 47.

30 **[0058]** En una realización, la cadena pesada del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 42 y la cadena ligera del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 47.

35 **[0059]** En una realización, se proporciona un anticuerpo aislado capaz de unirse a EGFR en tumores que contienen amplificaciones del gen de EGFR, en el que las células de los tumores contienen múltiples copias del gen de EGFR y en tumores que expresan la versión truncada del receptor de EGFR de2-7, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en el que la región variable de la cadena pesada comprende regiones de dominios de unión a polipéptido que tienen las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ DI Nos: 44, 45, 46 y en el que la región variable de la cadena ligera comprende regiones de dominios de unión a polipéptido que tienen las secuencias de aminoácidos establecidas en las SEQ DI Nos: 49, 50, 51.

40 **[0060]** Otros objetos y ventajas se harán evidentes para los expertos en la técnica a partir de una revisión de la consiguiente descripción detallada, que continúa con la referencia a los siguientes dibujos ilustrativos, y las reivindicaciones adjuntas.

45 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

50 **[0061]**

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

55 Las figuras 2A-D presentan los resultados del ELISA de mAb806, mAbDH8.3 y mAb528. (A) Unión de concentraciones crecientes de anticuerpo mAb 806 (▲) DH8.3 (●) o 528 (■) a placas de ELISA recubiertas con sEGFR. (B) Inhibición de la unión de mAb 806 y mAb528 a placas de ELISA recubiertas con sEGFR por concentraciones crecientes de sEGFR en solución. (C) Unión de concentraciones crecientes de DH8.3 al péptido de empalme de2-7 ilustra las curvas de unión para mAb806 y mAb528 a sEGFR de tipo salvaje inmovilizado (D).

60 Las Figuras 2E y 2F presentan gráficamente los resultados de los estudios de unión BIAcore utilizando péptido biotinilado C-terminal e incluyendo un anticuerpo monoclonal de la descripción, junto con otros anticuerpos

conocidos, entre ellos el anticuerpo L8A4 que reconoce el péptido de empalme del EGFR de2-7 mutante, y controles.

5 La Figura 3 describe la internalización del anticuerpo mAb806 y el anticuerpo DH8.3. Se preincubaron células U87MG.Δ2-7 con mAb806 (▲) o DH8.3 (●) a 4°C, se transfirieron a 37°C y se determinó la internalización mediante FACS. Los datos representan la internalización media en cada punto de tiempo ± SE de 3 (DH8.3) o 4 (mAb806) experimentos separados.

10 Las Figuras 4A y 4B ilustran la biodistribución (% ID/g tejido de tumor) de (a) mAb806-I¹²⁵ y (b) DH8.3-I¹³¹ radiomarcados en ratones desnudos que portan xenoinjertos U87MG y U87MG.Δ2-7. Cada barra representa la media de 5 ratones ± SE excepto para 1 hora donde n = 4.

15 Las Figuras 5A y 5B ilustran la biodistribución de los anticuerpos mAb806-I¹²⁵ (barra vacía) y DH8.3-I¹³¹ (barra opaca) radiomarcados expresada como las propartes (a) tumor:sangre o (b) tumor:hígado en ratones desnudos que portan xenoinjertos U87MG.Δ2-7. Cada barra representa la media de 5 ratones ± SE excepto para 1 hora donde n = 4.

20 Las Figuras 6A-C ilustran el análisis de citometría de flujo de líneas celulares que contienen la amplificación del gen de EGFR. Las células A431 se tiñeron con mAb806, DH8.3 o 528 (histogramas en negro) y se compararon con un anticuerpo IgG2b irrelevante (histograma vacío).

Las Figuras 7A y 7B ilustran la biodistribución (% ID/g tejido de tumor) de (a) mAb806-I¹²⁵ y (b) 528-I¹³¹ radiomarcados en ratones desnudos que portan xenoinjertos U87MG.Δ2-7 y A431.

25 Las Figuras 8A-8D ilustran la biodistribución de los anticuerpos mAb806-I¹²⁵ (barra vacía) y 528-I¹³¹ (barra opaca) y expresada en forma de propartes (A,B) tumor:sangre o (C,D) tumor:hígado en ratones desnudos que portaban (A,C) xenoinjertos U87MGΔ2-7 y (B,D) xenoinjertos A431.

30 Las Figuras 9A y 9B ilustran el efecto anti-tumoral de mAb806 sobre las velocidades de crecimiento de xenoinjerto (A) U87MG y (B) U87MG.Δ2-7 en un modelo preventivo. Se inyectaron s.c. 3×10^6 células U87MG o U87MG.Δ2-7 en ambos flancos de ratones desnudos BALB/c de 4-6 semanas de edad, (n=5) el día 0. Se inyectaron a los ratones i.p. o bien 1 mg de mAb806 (●); 0,1 mg de mAb806 (▲); o bien vehículo (O) empezando un día antes de la inoculación de las células tumorales. Se les administraron inyecciones tres veces por semana durante dos semanas según se indica mediante flechas. Los datos se expresan como el volumen medio del tumor ± S.E.

35 Las Figuras 10A, 10B y 10C ilustran el efecto anti-tumoral de mAb806 sobre xenoinjertos (A) U87MG, (B) U87MG.Δ2-7 y (C) U87MG.wtEGFR en un modelo establecido. Se inyectaron s.c. 3×10^6 células de U87MG, U87MG.Δ2-7, o U87MG.wtEGFR, en ambos flancos de ratones BALB/c desnudos de 4-6 semanas de edad, (n=5). Se inyectaron i.p. a los ratones dosis de 1 mg de mAb 806 (●); dosis de 0,1 mg de mAb806 (▲); o vehículo (O) empezando cuando los tumores habían alcanzado un volumen medio de tumor de 65 - 80 mm³. Las inyecciones se administraron tres veces por semana durante dos semanas según se indica mediante flechas. Los datos se expresan como el volumen medio del tumor ± S.E.

40 Las Figuras 11A y 11B ilustran el efecto anti-tumoral de mAb806 sobre xenoinjertos A431 en modelos (A) preventivos y (B) establecidos. Se inyectaron s.c. 3×10^6 células A431 en ambos flancos de ratones BALB/c desnudos de 4-6 semanas de edad (n=5). Se inyectaron a los ratones i.p. o bien dosis de 1 mg de mAb806 (●); o bien vehículo (O), empezando un día antes de la inoculación de las células tumorales en el modelo preventivo, o cuando los tumores habían alcanzado un volumen medio de tumor de 200 mm³. Las inyecciones se administraron tres veces por semana durante dos semanas como se indica mediante flechas. Los datos se expresan como el volumen medio del tumor ± S.E.

45 La Figura 12 ilustra el efecto anti-tumoral del tratamiento con mAb806 combinado con el tratamiento con AG1478 sobre xenoinjertos A431 en un modelo preventivo. Los datos se expresan como el volumen medio del tumor ± S.E.

50 La Figura 13 describe la unión de mAb806 a células A431 en presencia de concentraciones crecientes de AG1478 (0,5 μM y 5 μM).

55 Las Figuras 14A y 14B ilustran (A) la secuencia de ácidos nucleicos y la (B) traducción a aminoácidos de la misma del gen de la cadena VH de 806 (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, respectivamente).

60 Las Figuras 15A y 15 B ilustran (A) la secuencia de ácidos nucleicos y la (B) traducción a aminoácidos de la misma del gen de la cadena VL de 806 (SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, respectivamente).

La Figura 16 muestra la secuencia de cadena VH (SEQ ID No: 2) numerada según Kabat con las CDR (SEQ ID NO: 15, 16 y 17) subrayadas. Los restos clave de la secuencia de la cadena de VH (SEQ ID NO: 2) son el 24, 37, 48, 67 y 78.

5 La Figura 17 muestra la secuencia de cadena VL (SEQ ID No: 4) numerada según Kabat con las CDR (SEQ ID NO: 18, 19 y 20) subrayadas. Los restos clave de la secuencia de la cadena de VL (SEQ ID NO: 4) son el 36, 46, 57 y 71.

10 Las Figuras 18A-18D muestran los resultados de estudios in vivo diseñados para determinar el efecto terapéutico de la terapia con anticuerpos combinados, particularmente los anticuerpos mAb806 y 528. Los ratones recibieron inoculaciones de U87MG.Δ2-7 (A y B), U87MG.DK (C), o células A431 (D).

15 Las Figuras 19 A-D muestran el análisis de internalización mediante microscopía electrónica. Las células U87MG.Δ2-7 fueron preincubadas con mAb806 o DH8.3 seguido de IgG anti-ratón conjugado con oro a 4°C, transferidas a 37°C y la internalización fue examinada en diferentes puntos de tiempo mediante microscopía electrónica. (A) localización del anticuerpo DH8.3 en un pozo recubierto (flecha) después de 5 min; (B) internalización de mAb806 mediante macropinocitosis (flecha) después de 2 min; (C) localización de DH8.3 en lisosomas (flecha) después de 20 min; (D) localización de mAb 806 en lisosomas (flecha) después de 30 min. El aumento original para todas las imágenes es X30.000.

20 La Figura 20 muestra la autorradiografía de una sección de xenoinjerto U87MG.Δ2-7 recogida 8 horas después de la inyección de mAb806-¹²⁵I.

25 La Figura 21 muestra el análisis de citometría de flujo de líneas celulares que contienen una amplificación del gen de EGFR. Se tiñeron células HN5 y MDA-468 con un anticuerpo IgG2b irrelevante (histograma vacío con línea discontinua), mAb806 (histograma en negro) o 528 (histograma vacío con líneas cerradas). El anticuerpo DH8.3 era completamente negativo en ambas líneas celulares (datos no mostrados).

30 La Figura 22 muestra la inmunoprecipitación de EGFR a partir de líneas celulares. El EGFR fue inmunoprecipitado a partir de células U87MG.Δ2-7 marcadas con S³⁵ o células A431 con mAb806, anticuerpo sc-03 o un control de isotipo IgG2b. Las flechas en el lateral indican la posición de de2-7 y wtEGFR. Se obtuvieron patrones de bandas idénticas en 3 experimentos independientes.

35 La Figura 23 muestra una autorradiografía de una sección de xenoinjerto de A431 recogida 24 horas después de la inyección de mAb806-¹²⁵I, se indican las zonas de localización en tejido viable (flechas).

40 Las Figuras 24 A y 24B muestran el aumento de la supervivencia de ratones desnudos que portan xenoinjertos intracraneales U87 MG.ΔEGFR (A) y LN-Z308.ΔEGFR (B) con tratamiento con mAb806 sistémico. Las células U87MG.EGFR (1 x 10⁵) o LN-Z308.ΔEGFR (5 X 10⁵) fueron implantadas en cerebros de ratones desnudos, y los animales se trataron con mAb806, PBS, o isotipo IgG desde los días 0 a 14 después de la implantación.

45 Las figuras 24C y 24D muestran la inhibición del crecimiento de tumores intracraneales por tratamiento con mAb806. Los ratones desnudos (cinco por grupo) tratados con mAb806 o el control de isotipo IgG, fueron sacrificados el día 9 para U87 MG.EGFR (C) y el día 15 para LN-Z308.ΔEGFR (D), y sus cerebros fueron recogidos, fijados, y seccionados. Los datos se calcularon tomando el volumen de control del tumor como el 100%. Los valores son la media ± SD. ***, P < 0,001; control versus mAb 806. Puntas de flecha, tejido tumoral.

50 La figura 24E muestra el aumento de la supervivencia de ratones desnudos que portan xenoinjertos intracraneales U87MG.ΔEGFR con tratamiento con mAb806 intratumoral. Se implantaron células U87 MG.ΔEGFR como se ha descrito. Se inyectaron 10 mg de mAb806 o control de isotipo IgG en un volumen de 5 μl en el sitio de inyección del tumor en días alternos empezando el día 1 durante cinco veces.

55 Las Figuras 25A, 25B y 25C muestran que el mAb806 prolonga la supervivencia de los ratones con tumores cerebrales U87MG.wtEGFR pero no con tumores cerebrales U87MG.DK. o U87MG. Se implantaron células (5 X 10⁵) U87MG (A), U87 MG.DK (B), o U87 MG.wtEGFR (C) en cerebros de ratones desnudos, y se trataron los animales con mAb806 desde el día 0 al 14 después del implante seguido de observación una vez interrumpida la terapia.

60 La Figura 26 A muestra el análisis FACS de la reactividad de mAb806 con líneas de células U87MG. Se tiñeron células U87MG, U87 MG.ΔEGFR, U87MG.DK, y U87MG.wtEGFR con mAbs anti-EGFR 528, EGFR.1, y anticuerpo anti-ΔEGFR, mAb 806. El anticuerpo monoclonal EGFR.1 reconocía exclusivamente wtEGFR y el anticuerpo monoclonal 528 reaccionaba tanto con wtEGFR como con ΔEGFR. mAb806 reaccionaba intensamente con U87 MG.ΔEGFR y U87MG.DK y débilmente con U87MG.wtEGFR. Las barras en la abscisa, tinción máxima de células en ausencia de anticuerpo primario. Los resultados se reprodujeron en tres experimentos independientes.

La figura 26B muestra la inmunoprecipitación de mAb806 de las formas de EGFR. El mutante y el wtEGFR se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-EGFR, 528, EGFR.1, o anticuerpo anti-EGFR, mAb806, de células U87 MG (carril 1), U87Δ.EGFR (carril 2), U87MG.DK (carril 3), y U87MG.wtEGFR (carril 4) y después se detectaron mediante transferencia Western con anticuerpo anti-pan EGFR, C13.

5 Las figuras 27A y 27B muestran que el tratamiento sistémico con mAb806 disminuye la fosforilación de ΔEGFR y la expresión de Bcl-XL en tumores cerebrales U87 MG.ΔEGFR. Los tumores U87 MG.ΔEGFR fueron extirpados el día 9 del tratamiento con mAb806, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C antes de la preparación del lisado tumoral.

10 (A) Análisis de transferencia Western de la expresión y el grado de autofosforilación de ΔEGFR. Se sometieron 30 μg de lisados tumorales a geles de SDS-poliacrilamida, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, y se sondearon con mAb antifosfotirosina, a continuación se separaron y se volvieron a sondear con anticuerpo anti-EGFR, C13.

15 (B) Transferencia Western de Bcl-XL utilizando los mismos lisados tumorales que en (A). Se sondearon las membranas con anticuerpo policlonal anti Bcl-X humano. Carriles 1 y 2, tumores cerebrales U87MG.ΔEGFR tratados con control de isotipo; carriles 3 y 4, tumores cerebrales U87MG.ΔEGFR tratados con mAb806.

20 La figura 28 muestra que el tratamiento con mAb806 conduce a una disminución del crecimiento y vasculogénesis y a incrementos en la apoptosis y acumulación de macrófagos en tumores U87MG.ΔEGFR. Las secciones de los tumores se tiñeron para Ki-67. El índice de proliferación celular se evaluó mediante el porcentaje de células totales que eran positivas para Ki-67 de cuatro campos de alta potencia seleccionados al azar (X400) en tumores intracraneales de cuatro ratones de cada grupo. Los datos son la media ± SE. Las células apoptóticas se detectaron mediante análisis TUNEL. El índice apoptótico se evaluó mediante la proporción de células positivas en TUNEL:número total de células de

25 cuatro campos de alta potencia seleccionados al azar (X400) en tumores intracraneales de cuatro ratones de cada grupo. Los datos son la media ± SE. Las secciones de tumor se inmunotiñeron con anticuerpo anti-CD31. Se analizaron las MVA mediante análisis de imágenes por ordenador de cuatro campos seleccionados al azar (X200) de tumores intracraneales de cuatro ratones de cada grupo. Infiltrados peritumorales de macrófagos en tumores U87MG.ΔEGFR tratados con mAb806. Las secciones de tumor se tiñeron con anticuerpo anti-F4/80.

30 La figura 29 muestra un análisis citométrico de flujo de líneas celulares de glioma U87MG parentales y transfectadas. Las células se tiñeron con anticuerpo IgG2b irrelevante (histogramas vacíos) o anticuerpo 528 o mAb806 (histogramas opacos) según se indica.

35 La Figura 30 muestra la inmunoprecipitación de EGFR a partir de líneas celulares. Se inmunoprecipitó EGFR a partir de células U87MG.wtEGFR, U87MG.Δ2-7, y A431 marcadas con S³⁵ con mAb806 (806), anticuerpo sc-03 (c-terminal), o un control de isotipo IgG2b (con). Flechas, posición de de2-7 y wtEGFR.

40 La Figura 31 muestra secciones en parafina teñidas con H&E representativas de xenoinjertos U87MG.Δ2-7 y U87MG.wtEGFR. Los xenoinjertos U87MG.Δ2-7 (recogido 24 días después de la inoculación del tumor) y U87MG.wtEGFR (recogido 42 días después de la inoculación del tumor) se extirparon de los ratones tal como se describe en la figura 10 anterior, y se tiñeron con H&E. Los xenoinjertos U87MG.Δ2-7 (recogido 18 días después de la inoculación del tumor) y U87MG.wtEGFR (recogido 37 días después de la inoculación del tumor) tratados con vehículo mostraron muy pocas zonas de necrosis (panel izquierdo), mientras se observó una necrosis extensa (flechas) tanto en xenoinjertos U87MG.Δ2-7 como U87MG.wtEGFR tratados con mAb806 (panel derecho).

45 La Figura 32 muestra el análisis inmunohistoquímico de la expresión de EGFR en secciones congeladas derivadas de xenoinjertos U87MG, U87MG.Δ2-7, y U87MG.wtEGFR. Se recogieron secciones en los puntos de tiempo descritos en la figura 31 anterior. Se inmunotiñeron secciones de xenoinjerto con el anticuerpo 528 (panel izquierdo) y mAb806 (panel derecho). No se observó una disminución de la inmunorreactividad para wtEGFR, EGFR amplificado, o de2-7EGFR en los xenoinjertos tratados con mAb806. Coincidiendo con los datos in vitro, los xenoinjertos U87MG parentales fueron positivos para el anticuerpo 528, pero fueron negativos para la tinción con mAb806.

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

55 Las figuras 34A y 34B muestran el análisis de la biodistribución de ch806 radiomarcado con (A) I¹²⁵ o (B) In¹¹¹ realizado en ratones BALB/c desnudos que portaban tumores por xenoinjerto U87MG-de2-7. Se inyectaron a los ratones 5 μg de anticuerpo radiomarcado y en grupos de 4 ratones por punto de tiempo, se sacrificaron a las 8, 28, 48 o 74 horas. Se recogieron los órganos, se pesaron y se midió la radiactividad en un contador gamma.

Las figuras 35A y 35B representan (A) el % ID del tejido tumoral por gramo y (B) la proparte de tumor con respecto a sangre. El anticuerpo con Indio-111 muestra aproximadamente 30% de ID/gramo de tejido y una proparte tumor con respecto a tejido de 4,0.

5 La Figura 36 describe la eficacia terapéutica del anticuerpo quimérico ch806 en un modelo de tumor establecido. Se inocularon s.c. 3×10^6 células U87MG.Δ2-7 en 100 μl de PBS en ambos flancos de ratones hembra desnudos de 4-6 semanas de edad. El mAb806 se incluyó como control positivo. El tratamiento se inició cuando los tumores habían alcanzado un volumen medio de 50 mm³ y consistió en 1 mg de ch806 o mAb806 administrados i.p. durante un total de 5 inyecciones los días indicados. Los datos se expresaron como el volumen medio del tumor +/- S.E. para cada grupo de tratamiento.

10 La Figura 37 muestra la actividad CDC sobre la células diana (A) U87MG.de2-7 y (B) A431 para los anticuerpos IgG1 quiméricos anti-EGFR ch806 y de control cG250. Se presentan el porcentaje de citotoxicidad media (barras; ± SD) de las determinaciones por triplicado.

15 La Figura 38 muestra la ADCC sobre células dianas (A) U87MG.de2-7 y (B) A431 a una proparte Efector:Célula diana de 50:1 mediada por ch806 y control de isotipo cG250 (0-10 μg/ml). Los resultados se expresan como el porcentaje de citotoxicidad media (barras; ± SD) de determinaciones por triplicado.

20 La Figura 39 muestra ADCC mediada por 1 μg/ml de mAb806 y ch806 parental sobre células diana U87MG.de2-7 sobre un intervalo de propartes de Efector:Diana. Se presenta la media (barras; ± SD) de determinaciones por triplicado.

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

30 Las Figuras 41A, 41B y 41C muestran que después de la expansión clonal, se examinaron los sobrenadantes de cultivo de hibridoma por triplicado mediante ELISA en cuanto a la capacidad para neutralizar la actividad de unión al antígeno de ch806 o mAb 806 con sEGFR621. Los resultados de la media (± SD) demostraron la actividad antagonista de los mAb anti-idiotipo LMH-11, -12, -13 y -14 con el bloqueo en solución de la unión de ch806 y mAb806 murino a placas recubiertas con sEGFR (LMH-14 no mostrado).

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

40 La Figura 43 muestra la validación de las condiciones de ELISA farmacocinéticas óptimas utilizando 1 μg/ml de LMH-12 antiidiotipo y 1 μg/ml de LMH-12 biotinilado para la captura y detección, respectivamente. Se realizaron tres ELISA separados por cuadruplicado para medir ch806 en suero de donante (●) de tres donantes sanos o BSA al 1%/medio (■) con control de isotipo hu3S193 en suero (▲) o BSA al 1%/medio (▼). También se incluyeron los controles para producto conjugado secundario avidina-HRP (◆) y sustrato ABTS (hexágono) solo con cada ELISA. Los resultados de la media (± SD) muestran curvas de unión altamente reproducibles para medir ch806 (2 μg/ml - 1,6 ng/ml) en sueros con un límite de detección de 3 ng/ml. (n=12; 1-100 ng/ml, Coeficiente de Variación < 25%; 100 ng/ml- 5 μg/ml, Coeficiente de Variación < 15%). No era evidente ninguna unión de fondo con ninguno de los tres sueros sometidos a ensayo y se observó una unión insignificante con el control de isotipo hu3S193.

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

60 La Figura 45 describe la inmunoprecipitación de EGFR a partir de líneas celulares marcadas con S³⁵ (U87MG Δ2-7, U87MG-wtEGFR, y A431) con diferentes anticuerpos (anticuerpos SC-03, 806 y 528).

ES 2 540 802 T3

La Figura 46 describe la inmunoprecipitación de EGFR a partir de diferentes células (A431 y U87MGΔ2-7) en diferentes puntos de tiempo (tiempo de 0 a 240 minutos) después del marcaje por pulsos con metionina/cisteína S³⁵. Se utilizan anticuerpos 528 y 806 para la inmunoprecipitación.

5 La Figura 47 describe la inmunoprecipitación de EGFR a partir de diferentes líneas celulares (U87MGΔ2-7, U87MG-wtEGFR y A431) con diferentes anticuerpos (SC-03, 806 y 528) en ausencia de (-) y después de la digestión con Endo H (+) para separar el elevado contenido de carbohidratos de tipo manosa.

10 La Figura 48 describe la yodación en la superficie celular de las líneas celulares A431 y U87MGΔ2-7 seguido de inmunoprecipitación con el anticuerpo 806, y con o sin digestión con Endo H, confirmando que el EGFR unido por el mAb 806 sobre la superficie celular de las células A431 es una forma sensible a EndoH.

La figura 49 muestra el vector pREN ch806 LC Neo (SEQ ID NO: 7).

15 La figura 50 muestra el vector pREN ch806 HC Neo (SEQ ID NO: 8).

Las figuras 51A-D muestran las secuencias de ácido nucleico de VH y VL de mAb124 (SEQ ID Nos: 21 y 26, respectivamente) y secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 22 y 27, respectivamente).

20 Las figuras 52A-D muestran las secuencias de ácido nucleico de VH y VL de mAb1133 (SEQ ID Nos: 31 y 36, respectivamente) y secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 32 y 37, respectivamente).

25 La figura 53 muestra un gráfico de un plásmido de ADN del plásmido Lonza de gen doble combinado que incluye pEE12.4 que contiene el cartucho de expresión (VH + CH) de hu806H, y pEE6.4 que contiene el cartucho de expresión (VL + CL) de hu806L.

30 La figura 54 muestra la secuencia de ADN (SEQ ID NO: 41; complemento SEQ ID NO: 162) del plásmido Lonza combinado descrito en la figura 53. Esta secuencia también muestra todas las traducciones (SEQ ID NOS: 42-51 y 163-166) relevantes para el anticuerpo hu806. El plásmido ha sido verificado en la secuencia, y se han comprobado la secuencia codificante y la traducción. Las secciones de la secuencia se han sombreado para identificar regiones de interés; las regiones sombreadas corresponden a uniones por empalme reales. El código de colores es el siguiente:

(gris): región de la señal, secuencias de codificación iniciales encontradas en las regiones variables de cadena ligera y pesada;

35 (lavanda): cadena VH de hu806, región variable de cadena pesada remodelada;

(rosa): cadena CH de hu806, región constante de cadena pesada optimizada en codones;

(verde): cadena VL de hu806, región variable de cadena ligera remodelada; y

(amarillo): cadena CL de hu806, región constante de la cadena ligera optimizada en codones.

40 Las figuras 55A y 55B muestran las secuencias de aminoácidos traducidas de hu806 (cadenas VH y VL de SEQ ID NOS: 164 y 166 y sus respectivos péptidos señal de SEQ ID NOS: 163 y 165; cadenas CH y CL de SEQ ID NOS: 43 y 48), y se dan los números de Kabat para las cadenas VH y VL (SEQ ID NOS: 164 y 165, respectivamente), con las CDR (SEQ ID NOS: 44-46 y 49-51) subrayadas.

45 Las figuras 56A, 56B, 56C, 57A, 57B, y 57C muestran el paso inicial en el diseño de remodelación, la graduación de residuos de aminoácidos en la secuencia de mAb806 (cadena VH de SEQ ID NO: 167 y cadena VL de la SEQ ID NO: 12) para la exposición en la superficie. Los grados se dan en el número de asteriscos (*) encima de cada residuo, con los residuos más expuestas con tres asteriscos. Estas figuras incluyen un diseño que indica cómo los oligonucleótidos iniciales (cadena VH: Figura 56C y SEQ ID NOS: 52 y 169-177; cadena VL: Figura 57C y SEQ ID NOS: 62, 66, 68 y 181 -187) se solapan para formar el primer producto recubierto (cadena VH de SEQ ID NO: 168 y cadena VL de SEQ ID NO: 180).

50 La figura 58 muestra un mapa de secuencia de ADN de la cadena pesada de HuIgG1 optimizada en cocodnes (SEQ ID NO: 80; complemento SEQ ID NO: 178) y la traducción de aminoácidos (SEQ ID NO: 43).

55 La figura 59 muestra la alineación de proteínas comparando la secuencia de aminoácidos de VH + CH de hu806 (VH + CH de hu806 8C65AAG; SEQ ID NO: 81) con el archivo de referencia original para la cadena VH de mAb806 (SEQ ID NO: 167). Las regiones destacadas indican secuencias de aminoácidos conservados en la cadena VH. Las CDR están subrayadas. Los asteriscos reflejan los cambios que se planificaron y llevaron a cabo en el proceso de remodelación inicial. Los sitios numerados son referencias para las modificaciones posteriores.

60 La figura 60 muestra la alineación correspondiente para la secuencia de aminoácidos de VL + CL de hu806 (señal + VL + CL de hu806 8C65AAG; SEQ ID NO: 83) con el archivo de referencia original para la cadena VL de mAb806 (SEQ ID NO: 179). Contiene un archivo adicional (señal + VL + CL de hu806 r2vk1; SEQ ID NO: 82), un constructo precursor, que se incluyó para ilustrar el cambio realizado en la modificación # 7.

65

La figura 61 muestra la alineación de nucleótidos y aminoácidos de las secuencias señal + VL y CL de hu806 (V1 + C1 de hu806 8C65AAG; SEQ ID NOS: 190 y 188) con las secuencias de ch806 correspondientes (prEN ch806 LC Neo; LICR; SEQ ID NO: 189). Se ha modificado y anotado como se describe en la figura 62.

La figura 62 muestra la alineación de nucleótidos de la secuencia de señal + VH de hu806 (cadena VH de hu806 8C65AAG; SEQ ID NO: 192) con la secuencia de mAb806 correspondiente [cadena VH de mAb806 antes del cambio de codones (cc) y de recubrimiento (ven); SEQ ID NO: 191]. Se ilustran los cambios de nucleótidos detrás de los cambios de aminoácidos de las figuras 59 y 60, así como los cambios de ácidos nucleicos conservativos que no condujeron a un cambio en el aminoácido. El intrón entre la señal y la cadena VH en hu806 se ha eliminado para facilitar la visualización. Se subrayan la secuencia señal y CDR. La secuencia de aminoácidos correspondiente (SEQ ID NO: 42) se ha superpuesto en la alineación.

La figura 63 muestra la unión del anticuerpo hu806 purificado obtenido de células 293 transfectantes transitorias a EGFR-ECD recombinante tal como se determina por Biacore. No se observó unión a EGFR-ECD con anticuerpo de control IgG1 humana purificada.

La figura 64 muestra el documento de texto con formato GenBank de la secuencia (SEQ ID NO: 41) y anotaciones de plásmido que codifican hu806 IgG1.

La figura 65 muestra la alineación de secuencias de aminoácidos para CDR de mAb806 (SEQ ID NOS: 15-18, 20 y 193) y mAb175 (SEQ ID NOS: 130-132, 135 y 194-195). Están en negrita las diferencias de secuencia entre los dos anticuerpos.

Las figuras 66A y 66B muestran la tinción inmunohistoquímica de líneas celulares y de hígado humano normal con mAb175. (A) Se utilizó mAb175 biotinilado para teñir secciones preparadas a partir de bloques que contienen las células A431 (sobrexpresan el wtEGFR), células U87MG.Δ2-7 (expresan el Δ2-7EGFR) y células U87MG (expresan el wtEGFR en niveles modestos). (B) Tinción de hígado humano normal (400x) con mAb175 (panel izquierdo), control de isotipo (panel central) y el control de anticuerpo secundario (panel derecho). No se observó tinción específica sinusoidal o de hepatocitos.

Las figuras 67A, 67B, y 67C muestran la reactividad de mAb806 y mAb175 con fragmentos del EGFR expresado en levadura. (A) Histogramas de citometría de flujo representativas que representan la señal de fluorescencia media del marcaje de mAb175 y mAb806 de los fragmentos de EGFR expresados en levadura. Con la expresión en levadura hay un porcentaje de células que no expresan la proteína en su superficie dando lugar a 2 picos en el histograma. El anticuerpo 9E10 se utiliza como control positivo ya que todos los fragmentos contienen una etiqueta c-myc C-terminal lineal. (B) Resumen de la unión de anticuerpos a varios fragmentos de EGFR. (C) Los fragmentos de EGFR se desnaturalizaron por calentamiento de gránulos de levadura a 800°C durante 30 min. La etiqueta c-myc todavía fue reconocida por el anticuerpo 9E10 anti-myc en todos los casos, lo que demuestra que el tratamiento térmico no compromete la proteína expresada en la superficie de levadura. Se utilizó el anticuerpo de EGFR mAb225 sensible a la conformación para confirmar la desnaturalización.

Las figuras 68A, 68B, 68C, y 68D muestran los efectos antitumorales de mAb175 en xenoinjertos de cáncer de próstata y cerebral. (A) Los ratones (n = 5) que llevan xenoinjertos U87MG.Δ2-7 se inyectaron i.p. con PBS, 1 mg de mAb175 o mAb806 (control positivo), tres veces por semana durante dos semanas en los días 6, 8, 10, 13, 15 y 17 cuando el volumen del tumor de partida fue de 100 mm³. Los datos se expresan como el volumen tumoral medio +/- SE. (B) Las células se tiñeron con dos anticuerpos irrelevantes (azul sólido y verde hueco), mAb 528 para EGFR total (rosa, sólido), mAb806 (azul claro, hueco) y mAb175 (naranja, hueco) y a continuación se analizaron por FACS. (C) Las células DU145 se lisaron, se sometieron a IP con mAb 528, mAb806, mAb175 o dos anticuerpos irrelevantes independientes y a continuación se inmunotransfirieron para EGFR. (D) Los ratones (n = 5) que llevan xenoinjertos DU145 se inyectaron i.p. con PBS, 1 mg de mAb175 o mAb806, diariamente en los días 18-22, 25-29 y 39-43 cuando el volumen del tumor de partida fue 85 mm³. Los datos se expresan como el volumen medio del tumor +/- SE.

Las figuras 69A, 69B, 69C, 69D, 69E y 69F muestran las estructuras cristalinas de péptido EGFR 287-302 unido a los fragmentos Fab (A) Representación de Fab 806, con la cadena ligera, de color rojo; cadena pesada, azul; péptido unido, amarillo; y el EGFR₂₈₇₋₃₀₂ superpuesto de EGFR, púrpura. (B) Representación de Fab 175 con la cadena ligera, de color amarillo; cadena pesada, verde; péptido unido, lila; y EGFR₂₈₇₋₃₀₂ de EGFR (DI-3), púrpura. (C) Detalle de (B) que muestra la similitud de EGFR₂₈₇₋₃₀₂ en el receptor con el péptido unido a Fab 175. Los esqueletos peptídicos se muestran como trazas Cα y las cadenas laterales que interactúan como palos. Átomos de O son de color rojo; N, azul; S, naranja y C, para la cadena principal. (D) Superposición de EGFR con el complejo Fab175:péptido que muestra la superposición espacial. Coloración como en (C) con la superficie de EGFR187-286 de color turquesa. (E) Vista ortogonal a (D) con EGFR187-286 mostrado en azul opaco y la superficie de las cadenas ligera (naranja) y pesada (verde) transparentes. (F) Estereovista detallada del complejo de 175 Fab que mira en el sitio de unión al antígeno. Colorante como en (C) y los enlaces de hidrógeno de la cadena lateral en

puntos en negro. Las moléculas de agua escondidas en la formación del complejo se muestran como esferas de color rojo.

5 Las figuras 70A, 70B, 70C, y 70D muestran la influencia de la unión de cisteína 271-283 en la unión de mAb806 a EGFR. (A) Células transfectadas con wtEGFR, EGFR-C271A, EGFR-C283A o el mutante C271A/C283A se tiñeron con mAb528 (histograma rosa sólido), mAb806 (línea azul) o sólo el anticuerpo secundario (púrpura) y después se analizaron por FACS. La ganancia se creó utilizando un anticuerpo irrelevante emparejado por clase. (B) Las células BaF3 que expresan el EGFR-C271A o C271/283A EGFR fueron examinadas por su respuesta a EGF en un ensayo de MTT tal como se ha descrito. Se derivaron EC_{50s} mediante el ajuste de Boltzman de los puntos de datos. Los
10 datos representan la media y la desviación estándar de las mediciones por triplicado. (C) Las células BaF3 que expresan el tipo salvaje o el EGFR-C271A/C283A estaban desprovistas de IL-3 y suero, a continuación se expusieron a EGF o control del vehículo. Los lisados de células completas se separaron por SDS-PAGE y se inmunotransfirieron con anticuerpo anti-fosfotirosina (panel superior) o anticuerpo anti-EGFR (panel inferior). (D) Las células BaF3 que expresan el EGFR tipo salvaje (panel izquierdo) o C271A/C283A (panel derecho) se estimularon con concentraciones crecientes de EGF en presencia de no anticuerpo (símbolos abiertos), mAb 528 (círculos grises) o mAb806 (triángulos negros), ambos a 10 µg/ml. Los datos se expresan como media y desviación estándar de las mediciones por triplicado.

20 Las figuras 71A, 71B, y 71C muestran: (A) Imagen de cámara gamma de todo el cuerpo de la biodistribución de ¹¹¹In ch806 en un paciente con carcinoma metastásico de células escamosas de las cuerdas vocales, que muestra una captación cuantitativa elevada en el tumor en el cuello a la derecha (flecha). También se observa una actividad de la acumulación de sangre, y menor catabolismo de ¹¹¹In libre en el hígado. (B) Imagen de tomografía computarizada de fotón único (SPECT) del cuello de este paciente, que muestra la captación de ¹¹¹In-ch806 en tumor viable (flecha), con una reducción de la captación central que indica necrosis. (C) TAC correspondiente del cuello que demuestra una gran masa tumoral en el cuello a la derecha (flecha) con necrosis central.

30 Las figuras 72A y 72B muestran un modelo estéreo de la estructura del EGFR1-621 sin uniones. La columna vertebral del receptor está trazado en azul y el ligando TGF-alfa en rojo. El epítipo de mAb806/175 se dibuja en turquesa y los enlaces disulfuro en amarillo. Los átomos del enlace disulfuro que une el epítipo de nuevo al receptor se muestran en formato de relleno de espacios. El modelo se construyó mediante la extracción del dominio CR2 de EGFR-ECD de la conformación ligada a la estructura de un monómero de EGFR sin uniones en presencia de su ligando.

35 La figura 73 muestra la reactividad de mAb806 con fragmentos del EGFR. Los lisados de células 293T transfectadas con vectores que expresan las proteínas de fusión del fragmento de EGFR soluble 1-501 o del fragmento GH/EGFR (GH-274-501, GH-282-501, 290-501 y GH-GH-298-501) se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana y se inmunotransfirieron con mAb806 (panel izquierdo) o el anticuerpo anti-myc 9B11 (panel derecho).

40 Las figuras 74A y 74B muestran la secuencia de ácido nucleico de cadena VH de mAb175 (SEQ ID NO: 128) y la secuencia o secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 129), respectivamente.

Las figuras 75A y 75B muestran la secuencia de ácido nucleico de cadena VL de mAb175 (SEQ ID NO: 133) y la secuencia o secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 134), respectivamente.

45 Las figuras 76A, 76B, y 76C muestran: (A) Concentración del producto volumétrico y (B) concentración de células viables de transfectantes hu806 GS-CHO (14D8, 15B2 y 40A10) y GS-NS0 (36) en cultivos de matraces de agitación a pequeña escala (100 ml). La concentración del producto se estimó mediante ELISA utilizando el anti-idiotipo 806 como anticuerpo de recubrimiento y el Lote clínico: J06024 de ch806 como patrón; (C) Crecimiento y producción volumétrica de células transfectantes GS-CHO 40A10 en un biorreactor de tanque agitado de 15 L. Densidad de células viables (◆ x 10⁵ células/ml), viabilidad celular (■) y la producción (▲ mg/L).

55 Las figuras 77A, 77B, 77C, 77D y 77E muestran la cromatografía por exclusión de tamaño (Biosep SEC-S3000), Análisis de construcciones de anticuerpo hu806 purificadas por proteína A producidas por cultivo a pequeña escala y ch806 y mAb 806 de control. Los cromatogramas en A214nm se presentan en los paneles superiores y en A280 nm en la panel inferior de cada figura.

60 La figura 78 muestra la cromatografía por exclusión de tamaño (Biosep SEC-S3000), Análisis de construcción 40A10 de anticuerpo hu806 después de la producción a gran escala y la purificación por proteína A. El cromatograma en A214nm se presenta indicando el 98,8% de pureza con un 1,2% de agregado presente.

65 La figura 79 muestra que se utilizaron geles prefabricados de 4-20% Tris/glicina de Novex, EE.UU. en condiciones de SDS-PAGE estándar para analizar las preparaciones de hu806 transfectantes purificadas (5 µg) GS CHO (14D8, 15B2 y 40A10) y GS-NS0 (36) hu806 bajo condiciones reducidas. Las proteínas se detectaron por tinción con Coomassie azul.

- 5 La figura 80 muestra que se utilizaron geles prefabricados de 4-20% Tris/glicina de Novex, EE.UU. en condiciones de SDS-PAGE estándar para analizar las preparaciones de hu806 transfectantes purificadas (5 µg) GS CHO (14D8, 15B2 y 40A10) y GS-NS0 (36) bajo condiciones no reducidas. Las proteínas se detectaron por tinción con Coomassie azul.
- 10 La figura 81 muestra que se utilizaron geles prefabricados de 4-20% Tris/glicina de Novex, EE.UU. en condiciones de SDS-PAGE estándar para analizar las preparaciones de hu806 transfectantes purificadas (5 µg) GS CHO 40A10 después de la producción a gran escala. Las proteínas se detectaron por tinción con Coomassie azul.
- 15 La figura 82 muestra el análisis de gel por enfoque isoeléctrico de hu806 transfectante purificado GS CHO 40A10 (5 µg) después de la producción de 15L. Las proteínas se detectaron por tinción con Coomassie azul. El carril 1, marcadores de pI; Carril 2, hu806 (tres isoformas, pI 8,66 a 8,82); Carril 3, marcadores de pI.
- La figura 83 muestra la unión a las células A431: análisis de citometría de flujo de preparaciones de anticuerpos hu806 purificados por proteína A (20 µg/ml), e isotipo de control huA33 (20 µg/ml). Los controles incluyen anticuerpo secundario solo (verde) y ch806 (rojo). Las construcciones Hu806 se produjeron mediante cultivo a pequeña escala.
- 20 La figura 84 muestra la unión a células A431: análisis de citometría de flujo de preparaciones de anticuerpos mAb806, ch806 y hu806 40A10 purificados (20 µg/ml) que se unen - 10% de EGFR de tipo salvaje en la superficie celular, 528 (se une a EGFR tanto de tipo salvaje como de2 -7EGFR) y el anticuerpo control irrelevante (20 µg/ml) tal como se indica.
- 25 La figura 85 muestra la unión a células de glioma U87MG.de2-7. Análisis por citometría de preparaciones de anticuerpos mAb806, ch806 y hu806 40A10 purificados (20 µg/ml) y anti-EGFR 528 y el anticuerpo control irrelevante (20 µg/ml).
- La figura 86 muestra la unión específica de constructos de anticuerpo 806 radiomarcado con ¹²⁵I a: (A) células de glioma U87MG.de2-7 y (B) células de carcinoma A431.
- 30 La figura 87 muestra los análisis Scatchard: constructos de anticuerpos (A) ch806 y (B) hu806 radiomarcados con ¹²⁵I que se unen a células U87MG.de2-7.
- La figura 88 muestra los análisis Scatchard: constructos de anticuerpos (A) ch806 y (B) hu806 radiomarcados con ¹²⁵I que se unen a células A431.
- 35 La figura 89 muestra el análisis de BIAcore de la unión a epítipo del péptido287-302 EGFR 806 mediante el paso de (A) hu806 y (B) ch806 sobre el péptido inmovilizado en concentraciones crecientes de 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM y 300 nM.
- 40 La figura 90 muestra la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo mediada por ch806 y hu806 en células A431 diana determinada en (A) 1 µg/ml de cada anticuerpo en un intervalo de proporciones de efector a células diana (E:T = 0,78:1 a 100:1); (B) a E:T = 50:1 en un intervalo de concentraciones de cada anticuerpo (3,15 ng/ml - 10 µg/ml) en A431 diana.
- 45 La figura 91 muestra el tratamiento de xenoinjertos A431 establecidos en ratones Balb/c desnudos. Grupos de 5 ratones recibieron dosis de 6 X 1 mg durante 2 semanas de terapia con anticuerpos tal como se indica (flechas). La media de +/- SEM del volumen del tumor se presenta hasta la terminación del estudio.
- 50 La figura 92 muestra el tratamiento de xenoinjertos U87MG.de2-7 establecidos en ratones Balb/c desnudos. Grupos de 5 ratones recibieron dosis de 6 X 1 mg durante 2 semanas de terapia con anticuerpos tal como se indica (flechas). La media de +/- SEM del volumen del tumor se presenta hasta la terminación del estudio.
- 55 La figura 93 muestra desviaciones de los valores de desplazamiento químico de "random coil" para el péptido mAb806 (A) N, (B) y HN (C) HA. El péptido se preparó en una solución de H₂O que contiene 5% H₂O₂, NaCl 70 mM y NaPO₄ 50 mM a pH 6,8. Todos los espectros utilizados para las asignaciones secuenciales fueron adquiridas a 298K en un Bruker Avance500.
- 60 Las figuras 94A, 94B, 94C, 94D, 94E y 94F muestran imágenes de cámara gamma de cuerpo completo del paciente 7 A) anterior, y B) posterior, Día 5 después de la infusión de ¹¹¹In-ch806. La alta captación de ¹¹¹In-ch806 en las lesiones metastásicas en los pulmones (flechas) es evidente. C) y D) muestran lesiones metastásicas (flechas) en TAC. E) Imágenes de espectros 3D de tórax, y F) imágenes transaxiales registradas de SPECT y TAC que muestra la captación específica de ¹¹¹In-ch806 en lesiones metastásicas.
- 65 Las figuras 95A, 95B, 95C, 95D, 95E y 95F muestran imágenes planas de la cabeza y el cuello del paciente 8 obtenidas A) Día 0, D) Día 3 y C) Día 7 después de la infusión de ¹¹¹In-ch806. La actividad de la acumulación de sangre inicial se considera en el día 0, y la captación de ¹¹¹In-ch806 en un astrocitoma anaplásico en el lóbulo frontal

derecho es evidente antes del día 3 (flecha), y aumenta antes del Día 7. La captación específica de ^{111}In -ch806 se confirma en D) la imagen de SPECT del cerebro (flecha), en el lugar del tumor (flecha) evidente en E) ^{18}F -FDG PET, y F) MRI.

5 Las figuras 96A, 96B, 96C, y 96D muestran que la captación similar de ^{111}In -ch806 en el tumor es evidente en el paciente 3 en comparación con el paciente 4, a pesar de las diferencias en la expresión del antígeno de 806 en muestras de tumores seleccionadas. A) Localización de ^{111}In -ch806 en la metástasis pulmonar (flecha) en la imagen transaxial SPECT en el Paciente 4, con la actividad de acumulación de sangre cardíaca (B) evidente. B) TAC correspondiente. Se mostró que el tumor archivado tenía <10% de positividad para la expresión de 806. C) Localización de ^{111}In -ch806 en la metástasis pulmonar (flecha) en el paciente 3, con la actividad de acumulación de sangre cardíaca (B) evidente. D) TAC correspondiente. Se mostró que el tumor archivado tenía 50-75% de positividad para la expresión de 806.

15 La figura 97 muestra la farmacocinética de población agrupada de proteína ch806 medida por ELISA. ch806 observada y pronosticada (% ID/L) vs. tiempo después de la infusión (horas).

20 Las figuras 98A y 98B muestran resultados de pacientes individuales para A) Depuración normalizada de cuerpo completo y B) Depuración hepática de ^{111}In -ch806 en los niveles de dosis 5 mg/m² (■), 10 mg/m² (Δ), 20 mg/m² (V), y 40 mg/m² (◆). Regresión lineal para los conjuntos de datos que se indican en cada panel [A] $r^2 = 0,9595$; B) $r^2 = 0,9415$.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

25 **[0062]** Según la presente invención se pueden emplear biología molecular convencional, la microbiología, y técnicas de ADN recombinante dentro del conocimiento práctico de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-E [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).

30 **[0063]** Tal como se utilizan aquí, los siguientes definiciones se estima que tienen, sin limitación, las definiciones proporcionadas.

35 **[0064]** El término "miembro de unión específica" describe un miembro de un par de moléculas que tienen especificidad de unión entre sí. Los miembros de un par de unión específica pueden ser obtenerse naturalmente o producirse sintéticamente parcial o totalmente. Un miembro del par de moléculas tiene una zona sobre su superficie, o una cavidad, que se une específicamente y por lo tanto es complementaria a una organización espacial y polar concreta del otro miembro del par de moléculas. De este modo, los miembros del par tienen la propiedad de unirse específicamente entre sí. Los ejemplos de los tipos de pares de unión específica son antígeno-anticuerpo, biotina-avidina, hormona-receptor de hormona, receptor-ligando, enzima-sustrato. Esta solicitud se refiere a las reacciones de tipo antígeno-anticuerpo.

45 **[0065]** El término "expresión aberrante" en sus diferentes formas gramaticales puede significar e incluir cualquier expresión aumentada o alterada o expresión en exceso de una proteína en un tejido, por ejemplo un incremento en la cantidad de una proteína, causada por cualquier método incluyendo un aumento de la expresión o traducción, una modulación del promotor o un regulador de la proteína, una amplificación de un gen para una proteína, o un aumento de la vida media o la estabilidad, de manera que existe o se puede detectar en cualquier momento más proteína, a diferencia de un estado sin expresión en exceso. La expresión aberrante incluye y contempla cualquier escenario o alteración en el que la expresión de la proteína o la maquinaria de modificación post-traduccional en una célula es exigida o interrumpida de otro modo debido a un aumento de la expresión o a un incremento de los niveles o cantidades de una proteína, incluyendo cuando se expresa una proteína alterada, en forma de una proteína mutada o variante debido a una alteración, delección o inserción de la secuencia, o a un plegamiento alterado.

55 **[0066]** Es importante entender que el término "expresión aberrante" ha sido seleccionado específicamente en el presente documento para abarcar el estado en el que están presentes cantidades/niveles anormales (normalmente incrementadas) de la proteína, con independencia de la causa eficaz de esa cantidad o nivel anormal. De este modo, las cantidades anormales de proteína puede resultar de la expresión en exceso de la proteína en ausencia de amplificación del gen, que es el caso 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.

65 **[0067]** 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 EGFR. Esto, por lo tanto, representa la presentación en el

presente documento de descubrimientos experimentales en los que se hace referencia a la amplificación y para el uso de los términos “amplificación/amplificado” y similares al describir niveles anormales de EGFR. No obstante, es la observación de las cantidades o niveles anormales de la proteína la que define el entorno o la circunstancia en la que se contempla la intervención clínica como recurso para los miembros de unión de la invención, y por esta razón, la presente memoria considera que el término “expresión aberrante” capta más ampliamente el entorno causal que produce la correspondiente anomalía en los niveles de EGFR.

[0068] Por consiguiente, aunque se entiende que los términos “expresión en exceso o sobreexpresión” y “amplificación” en sus diferentes formas gramaticales tienen significados técnicos distintos, se deben considerar equivalentes entre sí, en tanto que representan el estado en el que están presentes los niveles anormales de proteína EGFR en el contexto de la presente invención. Por consiguiente, el término “expresión aberrante” ha sido seleccionado ya que se cree que subsume los términos “expresión en exceso” y “amplificación” dentro de su alcance para los fines de el presente documento, de manera que todos los términos pueden ser considerados equivalentes entre sí Tal como se utilizan en el presente documento.

[0069] El término “anticuerpo” describe una inmunoglobulina ya sea natural o producida parcial o totalmente sintéticamente. El término también abarca cualquier polipéptido o proteína que tenga un dominio de unión que sea, o sea homólogo a, un dominio de unión de un anticuerpo. Este término también contempla los anticuerpos injertados con CDR.

[0070] Como los anticuerpos pueden ser modificados de varias maneras, se debe considerar que el término “anticuerpo” abarca cualquier miembro de unión específica o sustancia que tenga un dominio de unión con la especificidad requerida. De este modo, este término abarca fragmentos de anticuerpos, derivados, equivalentes funcionales y homólogos de anticuerpos, incluyendo cualquier polipéptido que comprenda un dominio de unión de inmunoglobulina, ya sea natural o total o parcialmente sintético. Por lo tanto se incluyen las moléculas quiméricas que comprenden un dominio de unión de inmunoglobulina, o equivalente, fusionado a otro polipéptido. La clonación y expresión de los anticuerpos quiméricos se describen en los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023 y en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4.816.397 y 4.816.567.

[0071] Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de unirse a antígenos. Los ejemplos de los fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward, E.S. et al., Nature 341, 544-546 (1989)) que consiste en un dominio VH; (v) las regiones CDR aisladas; (vi) los fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos; (vii) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv), donde un dominio VH y un dominio VL están unidos por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a un antígeno (Bird et al, (1988) Science, 242, 423-426; Huston et al, (1988) PNAS USA, 85, 5879-5883); (viii) fragmentos de anticuerpos multivalentes (dímeros, trímeros y/o tetrámeros scFv (Power y Hudson (2000), J Immunol. Methods 242: 193-204) (ix) dímeros Fv de cadena sencilla biespecíficos (PCT/US92/09965) y (x) “diacuerpos”, fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos mediante fusión génica (documento WO94/13804; P. Holliger et al (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448).

[0072] Un “sitio de combinación de un anticuerpo” es aquella parte estructural de una molécula de anticuerpo comprendida por regiones variables e hipervariables de cadena ligera o cadena pesada y ligera que se une específicamente al antígeno.

[0073] La frase “molécula de anticuerpo” en sus diferentes formas gramaticales Tal como se utiliza en el presente documento contempla tanto una molécula de inmunoglobulina intacta como una parte inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina.

[0074] Las moléculas de anticuerpo de ejemplo son moléculas de inmunoglobulina intactas, moléculas de inmunoglobulina sustancialmente intactas y aquellas partes de una molécula de inmunoglobulina que contienen el parátipo, incluyendo aquellas partes conocidas en la técnica tales como Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v), cuyas partes se prefieren para su uso en los métodos terapéuticos descritos en el presente documento.

[0075] Los anticuerpos también pueden ser biespecíficos, donde un dominio de unión del anticuerpo es un miembro de unión específica de la invención, y el otro dominio de unión tiene una especificidad diferente, por ejemplo para reclutar una función efectora o similar. Los anticuerpos biespecíficos de la presente invención incluyen el caso en el que un dominio de unión del anticuerpo es un miembro de unión específica de la presente invención, incluyendo uno de sus fragmentos, y el otro dominio de unión es un anticuerpo distinto o uno de sus fragmentos, incluyendo un anticuerpo anti-EGFR distinto, por ejemplo el anticuerpo 528 (Patente de los Estados Unidos No. 4.943.533), el anticuerpo 225 quimérico y humanizado (Patente de los Estados Unidos Núm. 4.943.533 y documento WO/9640210), un anticuerpo anti-de2-7 tal como DH8.3 (Hills, D. et al (1995) Int. J. Cancer 63(4):537-543), un anticuerpo L8A4 y Y10 (Reist, CJ et al (1995) Cancer Res. 55(19): 4375-4382; Foulon CF et al. (2000) Cancer Res. 60(16):4453-4460), ICR62 (Modjtahedi H et al (1993) Cell Biophys. Enero-Junio; 22(1.3):129-46; Modjtahedi et al

(2002) P.A.A.C.R. 55(14):3140-3148, o el anticuerpo de Wikstrand et al (Wikstrand C. et al (1995) Cancer Res. 55(14):3140-3148). El otro dominio de unión puede ser un anticuerpo que reconoce o elige como diana un tipo concreto de célula, como en un anticuerpo específico de células neurales o gliales. En los anticuerpos biespecíficos de la presente invención el dominio de unión del anticuerpo de la invención se puede combinar con otros dominios de unión o moléculas que reconocen receptores celulares concretos y/o modulan células de una manera concreta, como por ejemplo un modulador inmunitario (por ejemplo, interleuquina o interleuquinas), un modulador del crecimiento o citoquina (por ejemplo, factor de necrosis tumoral (TNF), y particularmente, la modalidad biespecífica de TNF mostrada en el documento U.S.S.N. 60/355,838 presentado el 13 de Febrero de 2002) o una toxina (por ejemplo, ricina) o un agente o factor anti-mitótico o apoptótico.

[0076] Las partes Fab y F(ab')₂ de las moléculas de anticuerpo se pueden preparar mediante reacción proteolítica con papaína y pepsina, respectivamente, en moléculas de anticuerpo sustancialmente intactas mediante métodos que son bien conocidos. Véase por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 4.342.566 de Theofilopolous et al. Las partes de la molécula de anticuerpo Fab' también son bien conocidas y son producidas a partir de partes F(ab')₂ seguido de reducción de los enlaces disulfuro que unen las dos partes de la cadena pesada como 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 intacto.

[0077] La expresión "anticuerpo monoclonal" en sus diferentes formas gramaticales hace referencia a un anticuerpo que tiene solamente una especie de sitio de combinación del anticuerpo capaz de inmunorreaccionar con un antígeno concreto. Un anticuerpo monoclonal presenta de ese modo habitualmente una única afinidad de unión por cualquier antígeno con el que inmunorreacciona. Un anticuerpo monoclonal también puede contener una molécula de anticuerpo que tenga una pluralidad de sitios de combinación de anticuerpos, cada uno inmunoespecífico para un antígeno diferente; por ejemplo, un anticuerpo monoclonal biespecífico (quimérico).

[0078] El término "dominio de unión al antígeno" describe la parte de un anticuerpo que comprende la zona que se une específicamente y es complementaria a una parte o a todo un antígeno. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo se puede unir a una parte concreta del antígeno solamente, cuya parte se denomina epitopo. Un dominio de unión a antígeno puede ser proporcionado por uno o más dominios variables de un anticuerpo. Preferiblemente, un dominio de unión a un antígeno comprende una región variable de cadena ligera del anticuerpo (VL) y una región variable de una cadena pesada de un anticuerpo (VH).

[0079] "Modificación post-traducciona" puede abarcar una modificación cualquiera o una combinación de modificaciones, incluyendo una modificación covalente, que experimenta una proteína una vez que la traducción se ha completado y después de haber sido liberada desde el ribosoma o sobre el polipéptido naciente co-traduccionalmente. La modificación post-traducciona incluye, pero no está limitada, a fosforilación, miristilación, ubicuitinación, glicosilación, unión de coenzima, metilación y acetilación. La modulación post-traducciona puede modular o influir en la actividad de una proteína, en su destino intracelular o extracelular, en su estabilidad o vida media, y/o su reconocimiento por ligandos, receptores u otras proteínas. La modificación post-traducciona se puede producir en orgánulos celulares, en el núcleo o citoplasma o extracelularmente.

[0080] El término "específico" se puede utilizar para hacer referencia a la situación en la que un miembro de un par de unión específica no mostrará ninguna unión significativa con moléculas distintas de su pareja o parejas de unión específica. El término también es aplicable, por ejemplo, cuando un dominio de unión al antígeno es específico para un epitopo concreto que es portado por numerosos antígenos, en cuyo caso el miembro de unión específica que lleva el dominio de unión al antígeno será capaz de unirse a los diferentes antígenos que lleven el epitopo.

[0081] El término "comprende" se utiliza generalmente en el sentido de incluye, es decir que permite la presencia de una o más características o componentes.

[0082] El término "que consiste sustancialmente en" hace referencia a un producto, particularmente una secuencia peptídica, de un número definido de residuos que no está unido covalentemente a un producto más grande. En el caso del péptido de la invención referido anteriormente, los expertos en la técnica entenderán que se pueden contemplar, sin embargo, modificaciones menores en el extremo N o C del péptido, tales como la modificación química del extremo para añadir un grupo protector o similar, por ejemplo la amidación del extremo C.

[0083] El término "aislado" hace referencia al estado en el que estarán los miembros de unión específica de la invención, o el ácido nucleico que codifica tales miembros de unión, según la presente invención. Los miembros y el ácido nucleico estarán libres o sustancialmente libres de material con el cual están asociados naturalmente, tales como otros polipéptidos o ácido nucleicos que se encuentran en su entorno natural, o el entorno en el cual se preparan (por ejemplo cultivo celular) cuando dicha preparación es mediante tecnología de ADN recombinante practicada in vitro o in vivo. Los miembros y ácidos nucleicos se pueden formular con diluyentes o coadyuvantes e incluso con fines prácticos pueden ser aislados - por ejemplo los miembros se mezclarán normalmente con gelatina

u otros portadores si se utilizan para recubrir placas de microtitulación para su uso en inmunoensayos, o se mezclarán con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables cuando se utilicen en diagnóstico o terapia. Los miembros de unión específica pueden estar glicosilados, de forma natural o por medio de sistemas de células eucarióticas heterólogas, o pueden no estar glicosilados (por ejemplo, si se producen mediante la expresión en una célula procariótica).

[0084] Además, tal como se utiliza en el presente documento, los términos "glicosilación" y "glicosilado" incluyen y abarcan la modificación post-traducciona de las proteínas, denominadas glicoproteínas, mediante la adición de oligosacáridos. Los oligosacáridos se añaden en sitios de glicosilación de las glicoproteínas, incluyendo particularmente oligosacáridos unido a N y oligosacáridos unidos O. Los oligosacáridos unidos a N se añaden a un residuo de Asn, particularmente cuando el residuo de Asn está en la secuencia N-X-S/T, donde X no puede ser Pro ni Asp, y son los más comunes encontrados en las glicoproteínas. En la biosíntesis de glicoproteínas unidas a N, se forma primero un oligosacárido de tipo alto contenido de manosa (comprendido generalmente por dolicol, N-Acetilglucosamina, manosa y glucosa) en el retículo endoplasmático (RE). A continuación, las glicoproteínas del tipo de alto contenido de manosa se transportan desde el RE al aparato de Golgi, donde se producen un procesamiento y modificación adicionales de los oligosacáridos. Los oligosacáridos unidos a O se añaden al grupo hidroxilo de los residuos Ser o Thr. En los oligosacáridos unidos a O, primero se transfiere N-Acetilglucosamina al resto Ser o Thr por medio de la N-Acetilglucosaminiltransferasa en el RE. La proteína se mueve a continuación al aparato de Golgi donde se producen una modificación y una elongación de la cadena. Las modificaciones unidas a O se pueden producir con la simple adición del monosacárido OGlcNAc solo en aquellos sitios de Ser o Thr que también pueden ser fosforilados en lugar de glicosilados en condiciones diferentes.

[0085] Tal como se utiliza en el presente documento, "pg" representa picogramos, "ng" representa nanogramos, "ug" o "µg" representan microgramos, "mg" representa miligramos, "ul" o "µl" representa microlitros, "ml" representa mililitros, "l" representa litros.

[0086] Los términos "anticuerpo 806", "mAb806", "ch806" y cualquiera de las variantes no enumerada específicamente, pueden utilizarse en el presente documento indistintamente, y Tal como se utilizan en la presente solicitud y en las reivindicaciones hacen referencia a material proteínico, incluyendo proteínas individuales o múltiples, y se extiende a aquellas proteínas que tienen los datos de la secuencia de aminoácidos descritos en el presente documento y presentados en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 4, y el anticuerpo quimérico ch806 que se incorpora y forma parte de las SEQ ID NO: 7 y 8, 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 sustancialmente equivalente o alterada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, por ejemplo, tales como las modificaciones obtenidas a través de la mutagénesis dirigida al sitio, o puede ser accidental, tales como las obtenidas a través de mutaciones en huéspedes que son productores del complejo o sus denominadas subunidades. Asimismo, se pretende que los términos "anticuerpo 806", "mAb806" y "ch806" incluyan en su alcance proteínas citadas específicamente en el presente documento así como todos los análogos y variaciones alélicas sustancialmente homólogos.

[0087] Los términos "anticuerpo 806 humanizado", "hu806", y "anticuerpo 806 remodelado" y cualquier variante no indicada específicamente, se pueden utilizar indistintamente en el presente documento, y como se utiliza en la presente solicitud y en las reivindicaciones se refieren a material proteínico que incluye proteínas individuales o múltiples, y se extiende a aquellas proteínas que tienen los datos de la secuencia de aminoácidos descritas en el presente documento y que se presentan en SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 47, y el perfil de actividades expuesto en este documento y en las reivindicaciones. En consecuencia, se contemplan igualmente las proteínas que muestran actividad sustancialmente equivalente o alterada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, por ejemplo, tales como las modificaciones obtenidas a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tales como las obtenidas a través de mutaciones en huéspedes que son productores del complejo o sus denominadas subunidades. Además, los términos "anticuerpo 806 humanizado", "hu806", y "anticuerpo 806 remodelado" pretenden incluir en su alcance proteínas citadas específicamente en el presente documento así como todos los análogos y variaciones alélicas sustancialmente homólogos.

[0088] Los términos "anticuerpo 175" y "mAb175" y cualquier variante no indicada específicamente, se pueden utilizar indistintamente en el presente documento, y como se utiliza en la presente solicitud y en las reivindicaciones se refieren a material proteínico que incluye proteínas individuales o múltiples, y se extiende a aquellas proteínas que tienen los datos de la secuencia de aminoácidos descritas en el presente documento y que se presentan en SEQ ID NO: 129 y SEQ ID NO: 134, y el perfil de actividades expuesto en este documento y en las reivindicaciones. En consecuencia, se contemplan igualmente las proteínas que muestran actividad sustancialmente equivalente o alterada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, por ejemplo, tales como las modificaciones obtenidas a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tales como las obtenidas a través de mutaciones en huéspedes que son productores del complejo o sus denominadas subunidades. Además, los términos "anticuerpo 175" y "mAb175" pretenden incluir en su alcance proteínas citadas específicamente en el presente documento así como todos los análogos y variaciones alélicas sustancialmente homólogos.

[0089] Los términos "anticuerpo 124" y "mAb124" y cualquier variante no indicada específicamente, se pueden utilizar indistintamente en el presente documento, y como se utiliza en la presente solicitud y en las reivindicaciones se refieren a material proteínico que incluye proteínas individuales o múltiples, y se extiende a aquellas proteínas que tienen los datos de la secuencia de aminoácidos descritas en el presente documento y que se presentan en SEQ ID NO: 22 y SEQ ID NO: 27, y el perfil de actividades expuesto en este documento y en las reivindicaciones. En consecuencia, se contemplan igualmente las proteínas que muestran actividad sustancialmente equivalente o alterada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, por ejemplo, tales como las modificaciones obtenidas a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tales como las obtenidas a través de mutaciones en huéspedes que son productores del complejo o sus denominadas subunidades. Además, los términos "anticuerpo 124" y "mAb124" pretenden incluir en su alcance proteínas citadas específicamente en el presente documento así como todos los análogos y variaciones alélicas sustancialmente homólogos.

[0090] Los términos "anticuerpo 1133" y "mAb1133" y cualquier variante no indicada específicamente, se pueden utilizar indistintamente en el presente documento, y como se utiliza en la presente solicitud y en las reivindicaciones se refieren a material proteínico que incluye proteínas individuales o múltiples, y se extiende a aquellas proteínas que tienen los datos de la secuencia de aminoácidos descritas en el presente documento y que se presentan en SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 37, y el perfil de actividades expuesto en este documento y en las reivindicaciones. En consecuencia, se contemplan igualmente las proteínas que muestran actividad sustancialmente equivalente o alterada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, por ejemplo, tales como las modificaciones obtenidas a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tales como las obtenidas a través de mutaciones en huéspedes que son productores del complejo o sus denominadas subunidades. Además, los términos "anticuerpo 1133" y "mAb1133" pretenden incluir en su alcance proteínas citadas específicamente en el presente documento así como todos los análogos y variaciones alélicas sustancialmente homólogos.

[0091] Se prefiere que los residuos de aminoácido descritos en el presente documento estén en forma isomérica "L". Sin embargo, los residuos en forma isomérica "D" se pueden sustituir por cualquier residuo de aminoácido L, con tal que el polipéptido conserve la propiedad funcional de unión a inmunoglobulina deseada. NH₂ hace referencia al grupo amino libre presente en el extremo amino de un polipéptido. COOH hace referencia al grupo carboxi libre presente en el extremo carboxi de un polipéptido. Según la nomenclatura de polipéptidos convencional, J. Biol. Chem., 243:3552-59 (1969), las abreviaturas para los residuos de aminoácido se muestran en la siguiente Tabla de Correspondencias:

Tabla de correspondencia			Aminoácido
Símbolo	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

[0092] Se debe indicar que todas las secuencias de residuos de aminoácidos se representan en el presente documento mediante fórmulas cuya orientación de izquierda a derecha es en la orientación convencional de extremo amino al extremo carboxi. Además, se debe indicar que un guión al principio o al final de una secuencia de residuos de aminoácidos indica un enlace peptídico a una secuencia adicional de uno o más residuos de aminoácidos. 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.

[0093] Un "replicón" es cualquier elemento genético (por ejemplo, plásmido, cromosoma, virus) que funciona como unidad autónoma de replicación de ADN in vivo; es decir, capaz de replicación bajo su propio control.

[0094] 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.

5 **[0095]** Una “molécula de ADN” hace referencia la forma polimérica de los desoxirribonucleótidos (adenina, guanina, timina, o citosina) en su forma de cadena sencilla, o en una hélice de doble cadena. Este término hace referencia solamente a la estructura primaria y secundaria de la molécula, y no se limita a ninguna de sus formas terciarias concretas. De este modo, este término incluye ADN de doble cadena hallado, entre otros, en moléculas de ADN lineal (por ejemplo, fragmentos de restricción), virus, plásmidos, y cromosomas. En el estudio de la estructura de
10 moléculas de ADN de doble cadena concretas, las secuencias pueden describirse en el presente documento según la convención normal de dar solamente la secuencia en dirección 5’ a 3’ junto con la cadena no transcrita de ADN (es decir, la cadena que tiene una secuencia homóloga al ARNm).

15 **[0096]** Un “origen de replicación” hace referencia a aquellas secuencias de ADN que participan en la síntesis de ADN.

[0097] Una “secuencia codificante” de ADN es una secuencia de ADN de doble cadena que es transcrita y traducida a un polipéptido in vivo cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante están determinados por un codón de inicio en el extremo 5’ (amino) y un codón de parada de la traducción en el extremo 3’ (carboxilo). Una secuencia codificante puede incluir, pero no está limitada a, secuencias procarióticas, ADNc de ARNm eucariótica, secuencias de ADN genómico de ADN eucariótica (por ejemplo, de mamífero), e incluso secuencias de ADN sintéticas. Una señal de poliadenilación y una secuencia de terminación de la transcripción estarán localizadas normalmente en 3’ con respecto a la secuencia codificante.

25 **[0098]** 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.

30 **[0099]** Una “secuencia promotora” es una región reguladora de ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificante en dirección 3’. Con el fin de definir la presente descripción, la secuencia promotora está unida en su extremo 3’ por el sitio de inicio de la transcripción y se extiende en dirección 5’ para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectables por encima del fondo. En la secuencia promotora se encontrará un sitio de inicio de la transcripción (definido convenientemente por el mapeo con nucleasa S1), como también los dominios de unión a proteínas (secuencias consenso) responsables de la unión de la ARN polimerasa. Los promotores eucarióticos contendrán, a menudo, cajas “TATA” y cajas “CAT”. Los promotores procariotas contienen secuencias de Shine-Dalgarno además de las secuencias consenso -10 y -35.

40 **[0100]** Una “secuencia de control de la expresión” es una secuencia de ADN que controla y regula la transcripción y la traducción de otra secuencia de ADN. Una secuencia codificante está “bajo el control” de las secuencias de control transcripcional y traduccional en una célula cuando la ARN polimerasa transcribe la secuencia codificante a ARNm, que a continuación se traduce a la proteína codificada por la secuencia codificante.

45 **[0101]** 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 es desprendido por la célula huésped antes de que la proteína deje la célula. Se pueden encontrar secuencias señal asociadas con una variedad de proteínas nativas de procariotas y eucariotas.

50 **[0102]** El término “oligonucleótido,” tal como se utiliza en el presente documento en referencia a la sonda de la presente descripción, se define como una molécula comprendida por dos o más ribonucleótidos, preferiblemente más de tres. Su tamaño exacto dependerá de muchos factores que, a su vez, dependerán de la función y uso últimos del oligonucleótido.

55 **[0103]** El término “cebador”, tal como se utiliza en el presente documento, hace referencia a un oligonucleótido, ya sea de origen natural como en un digesto de restricción purificado o producido sintéticamente, que es capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión con cebadores, que es complementario a una cadena 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.
60 El cebador puede ser de cadena sencilla o de doble cadena y debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis del producto de extensión deseado en presencia del agente inductor. La longitud exacta del cebador dependerá de muchos factores, incluyendo la temperatura, la fuente del cebador y el uso del método. Por ejemplo, para aplicaciones diagnósticas, dependiendo de la complejidad de la secuencia diana, el cebador oligonucleotídico contiene habitualmente 15-25 o más nucleótidos, aunque puede contener menos nucleótidos.

65

5 **[0104]** Los cebadores del presente documento se seleccionan para que sean “sustancialmente” complementarios a diferentes cadenas de una secuencia de ADN diana concreta. Esto representa que los cebadores deben ser suficientemente complementarios para hibridar con sus respectivas cadenas. 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 complementaria a la cadena. Alternativamente, se pueden intercalar bases no complementarias o secuencias más largas en el cebador, siempre que la secuencia del cebador sea suficientemente complementaria a la secuencia de la cadena para hibridar con la misma y formar de ese modo el molde para la síntesis del producto de extensión.

10 **[0105]** Tal como se utilizan en el presente documento, los términos “endonucleasas de restricción” y “enzimas de restricción” hacen referencia a enzimas bacterianas, cada una de las cuales corta el ADN de doble cadena en o cerca de una secuencia de nucleótidos específica.

15 **[0106]** Una célula ha sido “transformada” por ADN exógeno o heterólogo cuando dicho ADN ha sido introducido dentro de la célula. El ADN transformante puede estar integrado o no (unido covalentemente) en el ADN cromosómico que forma el genoma de la célula. En células procariotas, levadura, y células de insecto, por ejemplo, el ADN transformante puede mantenerse en un elemento episómico, tal como un plásmido. Con respecto a las células eucarióticas, una célula transformada de manera estable es aquella en la que el ADN transformante se ha integrado en el cromosoma de manera que es heredado por las células hijas a través de la replicación del cromosoma. Esta estabilidad se demuestra por la capacidad de la célula eucariótica para establecer líneas celulares o clones comprendidos por una población de células hijas que contienen el ADN transformante. Un “clon” es una población de células derivadas de una única célula o ancestro común por mitosis. Una “línea celular” es un clon de una célula primaria que es susceptible de crecimiento estable in vitro durante muchas generaciones.

25 **[0107]** Dos secuencias de ADN son “sustancialmente homólogas” cuando al menos aproximadamente el 75% (preferiblemente al menos aproximadamente 80%, y muy preferiblemente al menos aproximadamente 90 o 95%) de los nucleótidos se emparejan a lo largo de una longitud definida de las secuencias de ADN. Las secuencias que son sustancialmente homólogas se pueden identificar comparando las secuencias utilizando un software estándar disponible en los bancos de datos de secuencias, o en un experimento de hibridación de Southern, por ejemplo, en condiciones restrictivas definidas para ese sistema concreto. La definición de las condiciones de hibridación apropiadas está dentro del alcance del experto en la técnica. Véanse, por ejemplo, Maniatis et al., supra; DNA Cloning, Vols. I & II, supra; Nucleic Acid Hybridization, supra.

35 **[0108]** Se debe entender que también están dentro del alcance de la presente descripción las secuencias de ADN que codifican miembros de unión específica (anticuerpos) de la invención que codifican anticuerpos que tienen las secuencias descritas, pero que son degeneradas a dichas secuencias. Por “degenerado a” se quiere significar que se utiliza un codón de tres letras diferente para especificar un aminoácido concreto. Es bien sabido en la técnica que se pueden utilizar los siguientes codones indistintamente para codificar cada aminoácido específico:

40	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
45	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
50	Histidina (His o H)	CAU o CAC
	Glutamina (Gln o Q)	CAA o CAG
	Asparagina (Asn o N)	AAU o AAC
	Lisina (Lis o K)	AAA o AAG
	Ácido aspártico (Asp o D)	GAU o GAC
55	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
	Triptófano (Trp o W)	UGG
60	Codón de terminación	UAA (ocre) o UAG (ámbar) o UGA (ópalo)

[0109] Se debe entender que los codones especificados anteriormente son para las secuencias de ARN. Los correspondientes codones para ADN tienen T que sustituye a U.

65 **[0110]** Se pueden realizar mutaciones en, por ejemplo, las secuencias descritas de los anticuerpos de la presente invención, de manera que se cambia un codón concreto por un codón que codifica un aminoácido diferente. Dicha

mutación se realiza generalmente llevando a cabo los menores cambios de nucleótidos posibles. Se puede realizar una mutación por sustitución de esta clase para cambiar un aminoácido de la proteína resultante de una manera no conservativa (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). Dicho 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 descripción incluye secuencias que contienen cambios conservativos que no alteran significativamente la actividad o características de unión de la proteína resultante.

[0111] Lo siguiente es un ejemplo de diferentes agrupamientos de aminoácidos:

Aminoácidos con grupos R no polares

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

Aminoácidos con grupos R polares no cargados

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

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

Ácido Aspártico, Ácido Glutámico

Aminoácidos básicos (cargados positivamente a pH 6,0)

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

[0112] Otros agrupamientos pueden ser aquellos aminoácidos con grupos fenilo: Fenilalanina, Triptófano, Tirosina.

[0113] Otro agrupamiento puede ser según el peso molecular (es decir, 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

[0114] 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.

[0115] Las sustituciones de aminoácidos también se pueden introducir para sustituir un aminoácido con una propiedad particularmente preferible. Por ejemplo, se puede introducir una Cys en un sitio potencial para puentes disulfuro con otra Cys. Se puede introducir una His en un sitio particularmente "catalítico" (es decir, la His puede actuar como ácido o base y es el aminoácido más común en catálisis bioquímica). Se puede introducir Pro debido a su estructura particularmente plana, que induce giros 3- en la estructura de la proteína.

[0116] Dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" cuando al menos aproximadamente 70% de los residuos de aminoácidos (preferiblemente al menos aproximadamente 80%, y muy preferiblemente al menos aproximadamente 90 o 95%) son idénticos, o representan sustituciones conservativas.

[0117] Una región "heteróloga" del constructo de ADN es un segmento identificable de ADN dentro de una molécula de ADN más grande que no se encuentra asociado con la molécula más grande en la naturaleza. De este modo, cuando la región heteróloga codifica un gen de mamífero, el gen estará flanqueado normalmente por ADN que no flanquea el ADN genómico de mamífero en el genoma del organismo de origen. Otro ejemplo de secuencia

codificante heteróloga es un constructo en el que la propia secuencia codificante no se encuentra en la naturaleza (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 que aparecen de forma natural no dan lugar a una región heteróloga de ADN tal como se define en el presente documento.

5 [0118] La expresión “farmacéuticamente aceptable” hace referencia a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y no producen habitualmente una reacción alérgica o perjudicial similar, tal como trastorno gástrico, mareo y similares, cuando se administran a un ser humano.

10 [0119] La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se utiliza en el presente documento para representar una cantidad suficiente para evitar, y preferiblemente reducir al menos en un 30 por ciento, preferiblemente reducir el menos en un 50 por ciento, preferiblemente al menos un 70 por ciento, preferiblemente al menos 80 por ciento, preferiblemente al menos 90%, un cambio clínicamente significativo en el crecimiento o progreso o actividad mitótica de una masa celular diana, un grupo de células cancerosas o tumor, u otro rasgo de la patología. Por ejemplo, se puede reducir el grado de activación o actividad o cantidad de EGFR o el número de células positivas para EGFR, particularmente de células reactivas o positivas a anticuerpos o miembros de unión.

15 [0120] Una secuencia de ADN está “unida operativamente” a una secuencia de control de la expresión cuando la secuencia de control de la expresión controla y regula la transcripción y traducción de esa secuencia de ADN. El término
 20 “unido 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
 25 señal de inicio apropiada, dicha señal de inicio se puede insertar delante del gen.

[0121] El término “condiciones de hibridación convencionales” hace referencia a unas 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 entenderá que dichas “condiciones de hibridación convencionales” dependen de condiciones concretas incluyendo la concentración de sodio y magnesio en el tampón, la longitud y concentración de la secuencia de nucleótidos, el porcentaje de emparejamientos erróneos, el porcentaje de formamida, y similares. También es importante en la determinación de las “condiciones de hibridación convencionales” si las dos secuencias que hibridan son ARN-ARN, ADN-ADN o ARN-ADN. Tales condiciones de hibridación convencionales son determinadas fácilmente por un experto en la técnica según fórmulas bien conocidas, donde la hibridación es habitualmente 10-20°C más baja que la T_m pronosticada o determinada con lavados de mayor restricción, si se desea.

30 [0122] La presente invención proporciona un nuevo miembro de unión específica, es decir, un anticuerpo o fragmento del mismo, que reconoce un epítipo EGFR que se encuentra en células tumorigénicas, hiperproliferativas o anormales en el que el epítipo se intensifica o es evidente tras la modificación post-traducciona aberrante y no es detectable en células normales o de tipo salvaje. En una realización particular pero no limitativa, el miembro de unión, es decir, el anticuerpo, reconoce un epítipo EGFR que está aumentado o es evidente tras la modificación de hidratos de carbono simple o glicosilación temprana y se reduce o no es evidente en presencia de modificación de hidratos de carbono complejos o glicosilación. El miembro de unión específica, es decir, el anticuerpo o fragmento
 45 del mismo, no se une a o reconoce células normales o de tipo salvaje que contienen epítipo de EGFR normal o de tipo salvaje en ausencia de sobreexpresión y en presencia de la modificación post-traducciona de EGFR normal.

[0123] La presente descripción proporciona además nuevos anticuerpos 806, 175, 124, 1133, ch806, y hu806 y fragmentos de los mismos, incluyendo fragmentos inmunogénicos, que reconocen un epítipo de EGFR, particularmente el péptido EGFR (287CGADSYEMEEDGVRKC₃₀₂ (SEQ ID NO: 14)), que se expone en las células tumorigénicas, hiperproliferativas o anormales en el que el epítipo es aumentado, revelado, y es no detectable en las células normales o de tipo salvaje. En un ejemplo no limitante particular, el anticuerpo reconoce un epítipo de EGFR que está aumentado o es evidente tras la modificación de hidratos de carbono simple o glicosilación temprana y se reduce o no es evidente en presencia de modificación de hidratos de carbono complejos o glicosilación. El anticuerpo o fragmento del mismo no se unen a o reconocen células normales o de tipo salvaje que contienen epítipo de EGFR normal o de tipo salvaje en ausencia de la sobreexpresión, amplificación, o un evento tumorigénico.

60 [0124] En un caso particular de la descripción y como se ha indicado anteriormente, los presentes inventores han descubierto los nuevos anticuerpos monoclonales 806, 175, 124, 1133, ch806 y hu806 que reconocen específicamente el EGFR de tipo salvaje amplificado y el EGFR de2-7, aunque se unen a un epítipo distinto del péptido de de empalme único de la mutación EGFR de2-7. Además, aunque mAb806, mAb175, mAb124, mAb1133, y hu806 no reconocen el EGFR normal de tipo salvaje expresado en la superficie celular de las células de glioma, se unen al dominio extracelular del EGFR inmovilizado en la superficie de placas de ELISA, indicando un epítipo conformacional con un aspecto de polipéptido.
 65

[0125] Es importante destacar que mAb806, mAb175, mAb124, mAb1133, ch806, y hu806 no se unen significativamente a los tejidos normales tales como hígado y piel, que expresan niveles de wtEGFR endógeno que son más altos que en la mayoría de los otros tejidos normales, pero en los que EGFR no se sobreexpresa (o expresa en exceso) o es amplificado. Por lo tanto, mAb806, mAb175, mAb124, mAb1133, y hu806 demuestran una especificidad nueva y útil, reconociendo EGFR de2-7 y EGFR amplificado, mientras no reconocen EGFR normal de tipo salvaje o el péptido de empalme único que es característico de EGFR de2-7. En un ejemplo preferido, mAb806, mAb175, mAb124, mAb1133, y hu806 de la presente descripción comprenden las secuencias de aminoácidos del dominio CDR de las cadenas VH y VL representados en las figuras 14B y 15B; 74B y 75B; 51B y 51D; 52B y 52D; y 55A y 55B, respectivamente (SEQ ID NOS: 2 y 4; 129 y 134; 22 y 27; 32 y 37; y 42 y 47, respectivamente; SEQ ID NO: 42 incluyendo el péptido señal de la cadena VH de hu806 y secuencias de la cadena VH de SEQ ID NOS: 163 y 164, respectivamente, y SEQ ID NO: 47, incluyendo el péptido señal de la cadena VL de hu806 y secuencias de la cadena VL de SEQ ID NOS: 165 y 166, respectivamente).

[0126] En otro caso, la descripción proporciona un anticuerpo capaz de competir con el anticuerpo 175, en condiciones en las cuales al menos 10% de un anticuerpo que tiene las secuencias de la cadena VH y VL del anticuerpo 175 (SEQ ID NOS: 129 y 134, respectivamente) está bloqueado de la unión a de2-7EGFR por competición con dicho anticuerpo en un ensayo ELISA. Como se ha expuesto anteriormente, los anticuerpos anti-idiotipo se contemplan en el presente documento.

[0127] La presente invención se refiere a miembros de unión específica, es decir, anticuerpos o fragmentos de los mismos, que reconocen un epítipo de EGFR que está presente en células que expresan EGFR amplificado o la expresión de EGFR de2-7 y no es detectable en células que expresan EGFR normal o de tipo salvaje, particularmente en presencia de la modificación postraduccional normal.

[0128] Se observa además y se demuestra en el presente documento que una observación o característica adicional no limitante de los anticuerpos de la presente invención es su reconocimiento de su epítipo en presencia de grupos de manosa elevada, lo que es una característica de glicosilación temprana o modificación con carbohidrato simple modificación. Por lo tanto, la glicosilación alterada o aberrante facilita la presencia y/o el reconocimiento del epítipo de anticuerpo o comprende una parte del epítipo de anticuerpo.

[0129] La glicosilación incluye y abarca la modificación post-traduccional de las proteínas, denominadas glicoproteínas, mediante la adición de oligosacáridos. Los oligosacáridos se añaden en sitios de glicosilación de las glicoproteínas, incluyendo particularmente oligosacáridos unido a N y oligosacáridos unidos O. Los oligosacáridos unidos a N se añaden a un residuo de Asn, particularmente cuando el residuo de Asn está en la secuencia N-X-S/T, donde X no puede ser Pro ni Asp, y son los más comunes encontrados en las glicoproteínas. En la biosíntesis de glicoproteínas unidas a N, se forma primero un oligosacárido de tipo alto contenido de manosa (comprendido generalmente por dolicol, N-Acetilglucosamina, manosa y glucosa) en el retículo endoplasmático (RE). A continuación, las glicoproteínas del tipo de alto contenido de manosa se transportan desde el RE al aparato de Golgi, donde se producen un procesamiento y modificación adicionales de los oligosacáridos. Los oligosacáridos unidos a O se añaden al grupo hidroxilo de los residuos Ser o Thr. En los oligosacáridos unidos a O, primero se transfiere N-Acetilglucosamina al resto Ser o Thr por medio de la N-Acetilglucosaminiltransferasa en el RE. La proteína se mueve a continuación al aparato de Golgi donde se producen una modificación y una elongación de la cadena.

[0130] En un caso particular de la descripción y tal como se indicó anteriormente, los presentes inventores han descubierto nuevos anticuerpos monoclonales, ejemplificados en el presente documento por los anticuerpos designados mAb806 (y su quimérico ch806), mAb175, mAb124, mAb1133, y hu806, que reconocen específicamente el EGFR de tipo salvaje amplificado y el EGFR de2-7, aunque se unen a un epítipo distinto del péptido de empalme único de la mutación EGFR de2-7. Los anticuerpos de la presente descripción reconocen específicamente EGFR sobreexpresado, incluyendo EGFR amplificado y EGFR mutante (ejemplificado en el presente documento por la mutación de2-7), en particular tras la modificación post-traduccional aberrante. Además, mientras que estos anticuerpos no reconocen el EGFR normal de tipo salvaje expresado en la superficie celular de las células de glioma, se unen al dominio extracelular del EGFR inmovilizado en la superficie de placas de ELISA, indicando un epítipo conformacional con un aspecto de polipéptido. Es importante destacar que estos anticuerpos no se unen significativamente a los tejidos normales, tales como hígado y piel, que expresan niveles de wtEGFR endógeno que son más altos que en la mayoría de los otros tejidos normales, sino donde EGFR no está sobreexpresado o amplificado. Por lo tanto, estos anticuerpos demuestran una especificidad nueva y útil, reconociendo EGFR de2-7 y EGFR amplificado, mientras no reconocen EGFR normal de tipo salvaje o el péptido de empalme único que es característico de EGFR de2-7.

[0131] En un ejemplo preferido, los anticuerpos son los que tienen las características de los anticuerpos que los inventores han identificado y caracterizado, en particular que reconocen EGFR amplificado y de2-7EGFR. En casos particularmente preferidos, los anticuerpos son mAb806, mAb175, mAb124, mAb1133, y hu806 y fragmentos activos de los mismos. En un ejemplo preferido adicional el anticuerpo de la presente descripción comprende las secuencias de aminoácidos de la cadena VH y VL representadas en las figuras 16 y 17; 74B y 75B; 51B y 51D; 52B y 52D; y 55A y 55B, respectivamente.

[0132] Preferiblemente, el epítipo del miembro de unión específica, es decir, el anticuerpo se encuentra dentro de la región que comprende los residuos 273-501 de la secuencia de EGFR de tipo salvaje normal o madura, y preferiblemente el epítipo comprende los residuos 287-302 de la secuencia de EGFR de tipo salvaje normal o madura (SEQ ID NO: 14). Por lo tanto, también se proporcionan proteínas de unión específica, es decir, anticuerpos que se unen a EGFR de2-7 en un epítipo localizado dentro de la región que comprende los residuos 273-501 de la secuencia de EGFR, y que comprende los residuos 287-302 de la secuencia de EGFR (SEC ID NO: 14). El epítipo puede determinarse por cualquiera de las técnicas de mapeo de epítopos convencionales conocidas por la persona experta en la técnica. Alternativamente, las secuencias de ADN que codifican los residuos 273-501 y 287-302 (SEQ ID NO: 14) podría ser digeridas, y los fragmentos resultantes expresados en un huésped adecuado. La unión del anticuerpo se podría determinar tal como se mencionó anteriormente.

[0133] En particular, el miembro se unirá a un epítipo que comprende los residuos 273-501, y que comprende más concretamente los residuos 287-302 (SEQ ID NO: 14), del EGFR de tipo salvaje normal o maduro. Sin embargo, otros anticuerpos que muestran el mismo patrón de reactividad o sustancialmente similar también forman un ejemplo de la descripción. Esto puede determinarse mediante la comparación de dichos miembros con un anticuerpo que comprende los dominios de cadena VH y VL mostrados en las SEQ ID NOS: 2 y 4; 129 y 134; 22 y 27; 32 y 37; y 42 y 47, respectivamente. La comparación habitualmente se realizará mediante una transferencia Western en la que miembros de unión se unen a transferencias duplicadas preparadas a partir de una preparación nuclear de las células de modo que el patrón de unión se puede comparar directamente.

[0134] En otro caso, la descripción proporciona un anticuerpo capaz de competir con mAb806 bajo condiciones en las cuales al menos 10% de un anticuerpo que tiene las secuencias de la cadena VH y VL de uno de dichos anticuerpos se bloquea de la unión a de2-7EGFR por competición con dicho anticuerpo en un ensayo ELISA. Tal como se ha expuesto anteriormente, los anticuerpos anti-idiotipo se contemplan y se ilustran en el presente documento.

[0135] En otro caso, la descripción proporciona un anticuerpo capaz de competir con mAb175, mAb124, y/o mAb1133 bajo condiciones en las cuales al menos 10% de un anticuerpo que tiene las secuencias de la cadena VH y VL de uno de dichos anticuerpos se bloquea de la unión a de2-7EGFR por competición con dicho anticuerpo en un ensayo ELISA. Tal como se ha expuesto anteriormente, los anticuerpos anti-idiotipo se contemplan y se ilustran en el presente documento.

[0136] En otro caso, la descripción proporciona un anticuerpo capaz de competir con mAb806, mAb175, mAb124, mAb 1133 y/o hu806, bajo condiciones en las cuales al menos 10% de un anticuerpo que tiene las secuencias de la cadena VH y VL de uno de dichos anticuerpos se bloquea de la unión a de2-7EGFR por competición con dicho anticuerpo en un ensayo ELISA. Tal como se ha expuesto anteriormente, los anticuerpos anti-idiotipo se contemplan y se ilustran en el presente documento.

[0137] Un polipéptido aislado que consiste esencialmente en el epítipo que comprende los residuos 273-501 y que comprende más concretamente los residuos 287-302 (SEQ ID NO: 14) de EGFR de tipo salvaje maduro forma otro ejemplo de la presente descripción. El péptido de la descripción es particularmente útil en ensayos de diagnóstico o kits y terapéutica o profilácticamente, incluyendo como una vacuna anti-tumor o anti-cáncer. De este modo, las composiciones del péptido de la presente descripción incluyen composición farmacéutica y composiciones inmunogénicas.

Usos diagnósticos y terapéuticos

[0138] La especificidad única de los miembros de unión específica, es decir, anticuerpos o fragmentos de los mismos, de la presente invención, mediante la cual el miembro o miembros de unión reconocen un epítipo de EGFR que se encuentra en células tumorigénicas, hiperproliferativas o anormales y no es detectable en células normales o de tipo salvaje y en el que el epítipo se aumenta o es evidente tras la modificación postraduccionales aberrante y en el que el miembro o miembros se unen al EGFR de2-7 y EGFR amplificado, pero no al wtEGFR, proporciona usos diagnósticos y terapéuticos para identificar, caracterizar, reconocer y tratar, reducir o eliminar un número de tipos de células tumorigénicas y tipos de tumores, por ejemplo tumores de cabeza y cuello, mama, pulmón, vejiga o próstata, y glioma, sin los problemas asociados con la absorción de tejido normal que se puede ver con anticuerpos de EGFR previamente conocidos. De este modo, las células que sobreexpresan EGFR (por ejemplo, por amplificación o expresión de un mutante o variante de EGFR), en particular los que demuestran una modificación post-traduccionales aberrante, pueden ser reconocidas, aisladas, caracterizadas, dirigidas y tratadas o eliminadas utilizando el miembro o miembros de unión, es decir, anticuerpo o anticuerpos o fragmentos de los mismos de la presente invención.

[0139] En un ejemplo adicional de la descripción, se proporciona un método de tratamiento de un tumor, un estado canceroso, una afección precancerosa, y cualquier afección relacionada con o resultante del crecimiento celular hiperproliferativo que comprende la administración de mAb806, mAb175, mAb124, mAb1133, y/o hu806.

5 [0140] Los anticuerpos de la presente invención pueden clasificar, por lo tanto, específicamente la naturaleza de los tumores o células tumorigénicas de EGFR, por tinción o reconocen de otro modo esos tumores o células en las que la sobreexpresión de EGFR, en particular la amplificación y/o mutación de EGFR, particularmente de2-7EGFR, está presente . Además, los anticuerpos de la presente invención, demuestran una actividad significativa anti-tumoral in vivo contra tumores que contienen EGFR amplificado y contra xenoinjertos de EGFR de2-7 positivos.

10 [0141] Como se indica anteriormente, los inventores han encontrado que el miembro de unión específica de la invención reconoce formas asociadas a tumores del EGFR (EGFR de2-7 y EGFR amplificado) pero no el receptor normal de tipo salvaje cuando se expresa en células normales. Se cree que el reconocimiento de anticuerpos depende de una modificación postraduccional aberrante (por ejemplo, una única glicosilación, acetilación o variante de fosforilación) del EGFR expresado en células que muestran la sobreexpresión del gen de EGFR.

15 [0142] Tal como se describe a continuación, los anticuerpos de la presente invención se han utilizado en estudios terapéuticos y se muestra que inhiben el crecimiento de la sobreexpresión de xenoinjertos de EGFR (por ejemplo, amplificados) y de xenoinjertos que expresan EGFR de2-7 humanos de tumores humanos y que inducen una necrosis significativa dentro de dichos tumores .

20 [0143] Además, los anticuerpos de la presente invención inhiben el crecimiento de tumores intracraneales en un modelo preventivo. Este modelo implica la inyección de células de glioma que expresan EGFR de2-7 en ratones desnudos y a continuación la inyección del anticuerpo intracranealmente ya sea en el mismo día o dentro de 1 a 3 días, opcionalmente con dosis repetidas. Las dosis de anticuerpo son adecuadamente de aproximadamente 10 ug. Los ratones inyectados con anticuerpo se comparan con los controles, y se ha encontrado que la supervivencia de los ratones tratados se incrementa significativamente.

25 [0144] Por lo tanto, en un ejemplo adicional de la descripción, se proporciona un método de tratamiento de un tumor, un estado canceroso, una afección precancerosa, y cualquier afección relacionada con o resultante del crecimiento celular hiperproliferativo que comprende la administración de un miembro de unión específica de la invención.

30 [0145] Los anticuerpos de la presente invención están diseñados para ser utilizados en métodos de diagnóstico y tratamiento de tumores en sujetos humanos o animales, en particular los tumores epiteliales. Estos tumores pueden ser tumores sólidos primarios o secundarios de cualquier tipo incluyendo, pero no limitado a, glioma, tumores de mama, pulmón, próstata, cabeza o cuello.

35 Miembro de unión y generación de anticuerpos

40 [0146] La metodología general para fabricar anticuerpos monoclonales por hibridomas es bien conocida. Las líneas celulares inmortales productoras de anticuerpos también pueden crearse mediante técnicas distintas de la fusión, tales como transformación directa de linfocitos B con ADN oncogénico, o transfección con el virus de Epstein-Barr. Véase, por ejemplo, M. Schreier et al, "Hybridoma Techniques (1980); Martilleo et al, "Monoclonal antibodies and T Cell Hybridomas" (1981); Kennett et al, "Monoclonal antibodies" (1980); véase también las patentes de Estados Unidos nº 4.341.761.; 4.399.121; 4.427.783; 4.444.887; 4.451.570; 4.466.917; 4.472.500; 4.491.632; y 4.493.890.

45 [0147] Los paneles de anticuerpos monoclonales producidos contra EFGR pueden ser examinados para diversas propiedades; es decir, isotipo, epítipo, afinidad, etc. De particular interés son los anticuerpos monoclonales que imitan la actividad del EFGR o sus subunidades. Tales anticuerpos monoclonales pueden identificarse fácilmente en ensayos de actividad de miembro de unión específica. Los anticuerpos de alta afinidad son también útiles cuando es posible la purificación por inmuoafinidad de miembro de unión específica nativa o recombinante.

50 [0148] Los métodos para producir anticuerpos anti-EFGR policlonales son bien conocidos en la técnica. Véase la patente de Estados Unidos Nº 4.493.795 de Nestor et al. Un anticuerpo monoclonal, que contiene habitualmente partes Fab y/o F(ab')₂ de moléculas de anticuerpo útiles, puede prepararse utilizando la tecnología de hibridoma descrita en Antibodies-A Laboratory Manual, Harlow y Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1988). Brevemente, para formar el hibridoma a partir del cual se produce la composición de anticuerpo monoclonal, un mieloma u otra línea celular que se autoperpetúa se fusiona con linfocitos obtenidos del bazo de un mamífero hiperinmunizado con un EGFR apropiado.

60 [0149] Los esplenocitos normalmente se fusionan 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 útil en la práctica de esta invención se identifican por su capacidad para inmunoreaccionar con el presente anticuerpo o miembro de unión y su capacidad para inhibir la actividad tumorigénica o hiperproliferativa especificada en las células diana.

65 [0150] Un anticuerpo monoclonal útil en la práctica de la presente invención se puede producir iniciando un cultivo de hibridoma monoclonal que comprende un medio nutriente que contiene un hibridoma que segrega moléculas de anticuerpo de la especificidad de antígeno apropiada. El cultivo se mantiene en condiciones y durante un período de tiempo suficiente para que el hibridoma secrete las moléculas de anticuerpo en el medio. Después se recoge el

medio que contiene anticuerpos. Las moléculas de anticuerpo se pueden aislar posteriormente mediante técnicas bien conocidas.

5 [0151] Los medios útiles para la preparación de estas composiciones son bien conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente e incluyen medios de cultivo sintéticos, ratones endogámicos y similares. Un medio sintético de ejemplo es el medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM; Dulbecco et al, Virology 8: 396 (1959).) suplementado con 4,5 g/l de glucosa, 20 mm de glutamina, y 20% de suero de ternera fetal. Una cepa de ratón endogámico de ejemplo es la Balb/c.

10 [0152] Los métodos para producir anticuerpos anti-EGFR monoclonales también son bien conocidos en la técnica. Ver Niman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 4949-4953 (1.983). Habitualmente, el EGFR o un análogo de péptido se utiliza ya sea solo o conjugado con un portador inmunogénico, como el inmunógeno en el procedimiento antes descrito para la producción de anticuerpos monoclonales anti-EGFR. Los hibridomas se criban para la capacidad de producir un anticuerpo que reacciona inmunológicamente con el EGFR presente en las células tumorigénicas, hiperproliferativas o anormales. Otros anticuerpos anti-EGFR incluyen, pero no se limitan a, el anticuerpo HuMax-EGFr de Genmab/Medarex, el anticuerpo 108 (ATCC HB9764) y en la Patente de Estados Unidos N° 6.217.866, y el anticuerpo 14E1 de Schering AG (Patente de Estados Unidos N° 5.942.602).

20 Miembros de unión recombinantes, quiméricos, biespecíficos y fragmentos

[0153] En general, las regiones CDR1, que comprenden secuencias de aminoácidos sustancialmente fijadas como las regiones CDR1 de SEQ ID NOS: 2 y 4; 129 y 134; 22 y 27; 32 y 37; y 42 y 47, respectivamente, se contendrán en una estructura que permite la unión de las regiones CDR1 a un antígeno tumoral. En el caso de la región CDR1 de la SEQ ID NO: 4, por ejemplo, ésta está contenida preferiblemente por la región de la cadena VL de SEQ ID NO: 4 (y de manera similar para las otras secuencias citadas).

[0154] En general, las regiones CDR2, que comprenden secuencias de aminoácidos sustancialmente fijadas como las regiones CDR2 de SEQ ID NOS: 2 y 4; 129 y 134; 22 y 27; 32 y 37; y 42 y 47, respectivamente, se contendrán en una estructura que permite la unión de las regiones CDR2 a un antígeno tumoral. En el caso de la región CDR2 de la SEQ ID NO: 4, por ejemplo, ésta está contenida preferiblemente por la región de la cadena VL de SEQ ID NO: 4 (y de manera similar para las otras secuencias citadas).

35 [0155] En general, las regiones CDR3, que comprenden secuencias de aminoácidos sustancialmente fijadas como las regiones CDR3 de SEQ ID NOS: 2 y 4; 129 y 134; 22 y 27; 32 y 37; y 42 y 47, respectivamente, se contendrán en una estructura que permite la unión de las regiones CDR3 a un antígeno tumoral. En el caso de la región CDR3 de la SEQ ID NO: 4, por ejemplo, ésta está contenida preferiblemente por la región de la cadena VL de SEQ ID NO: 4 (y de manera similar para las otras secuencias citadas).

40 [0156] Por "sustancialmente fijadas" se quiere decir que esas regiones CDR, por ejemplo, las regiones CDR3 de la descripción serán idénticas o altamente homólogas a las regiones determinadas de la SEQ ID N°: 2 y 4; 129 y 134; 22 y 27; 32 y 37; y 42 y 47, respectivamente. Por "altamente homóloga" se contempla que sólo unas pocas sustituciones, preferiblemente de 1 a 8, preferiblemente de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 4, o de 1 a 3 o 1 o 2 sustituciones se pueden realizar en una o más de las CDR. También se contempla que tales términos incluyen truncamientos en las CDRs, siempre que el anticuerpo resultante presente las propiedades únicas de la clase de anticuerpos discutidas en el presente documento, tal como por mAb806, mAb175, mAb124, mAb1133 y hu806.

50 [0157] La estructura para contener las CDR de la descripción, en particular CDR3, será generalmente de una secuencia de cadena pesada o ligera del anticuerpo o parte sustancial de la misma en la cual las regiones CDR están situadas en ubicaciones correspondientes a la región CDR de dominios variables de anticuerpos de cadena VH y VL de origen natural codificados por genes de inmunoglobulina redistribuidos. Las estructuras y ubicaciones de los dominios variables de inmunoglobulina pueden determinarse por referencia a Kabat, EA et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4ª Edición. Departamento de Salud y Servicios Humanos. 1987, y sus actualizaciones, ahora disponibles en Internet

55 [0158] (<http://immuno.bme.nwu.edu>). Además, como es sabido por los expertos en la técnica, las determinaciones de CDR se pueden hacer de varias maneras. Por ejemplo, pueden usarse Kabat, Chothia y análisis combinados de determinación de dominio. En este sentido, véase por ejemplo <http://www.bioinf.org.uk/abs/#cdrid>.

60 [0159] Las secuencias de aminoácidos sustancialmente fijadas como los residuos CDR de la cadena VH en los anticuerpos de la invención están en un dominio variable de cadena pesada humano o una parte sustancial del mismo, y las secuencias de aminoácidos sustancialmente fijadas como los residuos de CDR de la cadena VL en los anticuerpos de la invención están en un dominio variable de cadena ligera humano o una parte sustancial del mismo.

65 [0160] Los dominios variables se pueden derivar de cualquier línea germinal o dominio variable humano redistribuido, o podrían ser un dominio variable sintético basado en secuencias consenso de dominios variables humanos conocidos. Las secuencias derivadas de CDR3 de la descripción, por ejemplo, tal como se define en el

párrafo anterior, pueden introducirse en un repertorio de dominios variables que carecen de regiones CDR3, usando la tecnología del ADN recombinante.

5 [0161] Por ejemplo, Marks et al (Bio/Technology, 1992,10: 779-783) describen métodos para producir repertorios de dominios variables de anticuerpos en los que cebadores consenso dirigidos a o adyacentes al extremo 5' de la zona de dominio variable se utilizan conjuntamente con cebadores consenso a la tercera región armazón de genes de VH humanos para proporcionar un repertorio de dominios variables de VH que carecen de una CDR3. Marks et al describen además cómo este repertorio se puede combinar con una CDR3 de un anticuerpo particular. Usando técnicas análogas, las secuencias derivadas de CDR3 de la presente descripción pueden mezclarse con repertorios de dominios de VH o VL que carecen de CDR3, y los dominios de VH o VL completos mezclados combinados con un posible dominio de VL o VH para proporcionar miembros de unión específica de la descripción. El repertorio puede entonces expresarse en un sistema huésped adecuado tal como el sistema de expresión de fagos de WO92/01047, de manera que se pueden seleccionar los miembros de unión específicos adecuados. Un repertorio puede consistir de cualquier cosa desde 10^4 miembros individuales hacia arriba, por ejemplo de 10^6 a 10^8 o 10^{10} miembros.

10 [0162] Técnicas de mezcla o barajado o combinatorias análogas se describen también por Stemmer (Nature, 1994,370: 389-391), que describe la técnica en relación a un gen de p-lactamasa, pero observa que el enfoque puede ser utilizado para la generación de anticuerpos .

15 [0163] Una alternativa adicional es generar regiones nuevas de VH o VL que llevan las secuencias derivadas de CDR3 de la descripción usando mutagénesis aleatoria de, por ejemplo, genes de VH o VL de mAb806 para generar mutaciones dentro de todo el dominio variable. Dicha técnica está descrita por Gram et al (1992, Proc Natl Acad Sci, USA, 89: 3.576-3.580), que utiliza PCR propensa a errores.

20 [0164] Otro método que puede usarse es dirigir la mutagénesis a regiones CDR de genes de VH o VL. Tales técnicas se describen por Barbas et al, (1994, Proc Natl Acad Sci, USA, 91: 3809-3813) y Schier et al. (1996, J. Mol Biol 263: 551-567).

25 [0165] Todas las técnicas descritas anteriormente son conocidas como tales en la técnica y en sí mismas no forman parte de la presente invención. La persona experta será capaz de usar tales técnicas para proporcionar miembros de unión específica de la invención usando metodología rutinaria en la técnica.

30 [0166] Una parte sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina comprenderá al menos las tres regiones CDR, junto con sus regiones armazón intermedias. Preferiblemente, la parte también incluirá al menos aproximadamente 50% de una o ambas de la primera y cuarta regiones armazón, siendo el 50% el 50% C-terminal de la primera región armazón y el N-terminal el 50% de la cuarta región armazón. Los residuos adicionales en el extremo N-terminal o C-terminal de la parte sustancial del dominio variable pueden ser aquellos normalmente no asociados con las regiones de del dominio variable de origen natural. Por ejemplo, la construcción de miembros de unión específica de la presente invención realizada mediante técnicas de ADN recombinante puede dar lugar a la introducción de residuos N- o C-terminales codificados por enlazadores introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Otras etapas de manipulación incluyen la introducción de enlazadores para unir dominios variables de la invención a secuencias de proteínas adicionales incluyendo cadenas pesadas de inmunoglobulina, otros dominios variables (por ejemplo en la producción de diacuerpos) o etiquetas de proteínas como se discute en más detalle a continuación.

35 [0167] Aunque en un ejemplo preferido de la descripción, se prefieren los miembros de unión específica que comprenden un par de dominios de unión basados en secuencias sustancialmente fijadas en SEQ ID NOS: 2 y 4; 129 y 134; 22 y 27; 32 y 37; y 42 y 47, respectivamente, los dominios de unión individuales, basados en estas secuencias forman casos adicionales de la descripción. En el caso de los dominios de unión basados en la secuencia sustancialmente fijada en cadenas VH, dichos dominios de unión pueden ser utilizados como agentes de reconocimiento para antígenos tumorales ya que se sabe que los dominios VH de inmunoglobulina son capaces de unirse a antígenos diana de una manera específica.

40 [0168] En el caso de cualquiera de los dominios de unión específica de cadena sencilla, estos dominios pueden ser utilizados para la detección de dominios complementarios capaces de formar un miembro de unión específica de dos dominios que tiene propiedades in vivo tan buenas o iguales que los anticuerpos mAb806, ch806, mAb175, mAb124, mAb1133 y hu806 aquí descritos.

45 [0169] Esto se puede lograr por métodos de cribado con expresión en fagos utilizando el denominado enfoque combinatorio dual jerárquico tal como se describe en la patente US 5.969.108, en el que se usa una colonia individual que contiene un clon de cadena H o L para infectar una biblioteca completa de clones que codifican la otra cadena (L o H) y el miembro de unión específica de dos cadenas resultante se selecciona según técnicas de expresión en fagos tales como las descritas en esa referencia. Esta técnica también se describe en Marks et al, ibid.

[0170] Los miembros de unión específica de la presente invención pueden comprender además regiones constantes de anticuerpo o partes de las mismas. Por ejemplo, los miembros de unión específica basados en secuencias de la cadena VL pueden estar unidos en su extremo C-terminal a dominios constantes de la cadena ligera de anticuerpo incluyendo cadenas C κ o C λ humanas, preferiblemente cadenas C λ . Del mismo modo, los miembros de unión específica basados en secuencias de la cadena VH pueden estar unidos en su extremo C-terminal a la totalidad o parte de una cadena pesada de inmunoglobulina derivada de cualquier isotipo de anticuerpo, por ejemplo, IgG, IgA, IgE, IgD e IgM y cualquiera de las subclases de isotipo, particularmente IgG1, IgG2b, e IgG4. Se prefiere IgG1.

[0171] La aparición de la tecnología de anticuerpo monoclonal (mAb) hace más de 25 años ha proporcionado un enorme repertorio de reactivos de investigación útiles y ha creado la oportunidad de utilizar anticuerpos como reactivos farmacéuticos aprobados en la terapia del cáncer, trastornos autoinmunes, rechazo de trasplantes, profilaxis antiviral y como antitrombóticos (Glennie y Johnson, 2000). La aplicación de la ingeniería molecular para convertir mAbs murinos en mAbs quiméricos (región V de ratón-región C humana) y reactivos humanizados donde sólo las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de mAb son de origen murino ha sido crítica para el éxito clínico de la terapia con mAb. Los mAbs diseñados tienen una inmunogenicidad notablemente reducida o ausente, una vida media en suero aumentada y la parte Fc humana del mAb aumenta el potencial para reclutar los efectores inmunes de células de complemento y citotóxicas (Clark 2000). Las investigaciones sobre la biodistribución, la farmacocinética y cualquier inducción de una respuesta inmune a mAbs administrados clínicamente requieren el desarrollo de análisis para discriminar entre las proteínas farmacéuticas y las proteínas endógenas.

[0172] Los anticuerpos, o los fragmentos de los mismos, también pueden estar conjugados o fusionados recombinantemente a cualquier toxina celular, bacteriana o de otro tipo, por ejemplo, exotoxina de *Pseudomonas*, ricina, o la toxina de la difteria. La parte de la toxina utilizada puede ser toda la toxina, o cualquier dominio particular de la toxina. Tales moléculas de anticuerpo-toxina se han utilizado con éxito para el reconocimiento y la terapia de diferentes tipos de cánceres, ver por ejemplo, Pastan, *Biochim Biophys Acta*. 1997 24 de octubre; 1333 (2): C1-6; Kreitman et al., *N. Engl. J. Med.* 2001 26 de julio; 345 (4): 241-7; Schnell et al., *Leukemia*. 2000 Ene; 14 (1): 129-35; Ghetie et al., *Mol. Biotechnol.* 2001 Jul; 18 (3): 251-68.

[0173] Los multímeros y biespecíficos y triespecíficos se pueden formar por asociación de diferentes moléculas de scFv y se han diseñado como reactivos de reticulación para el reclutamiento de células T en los tumores (inmunoterapia), re-direccionamiento viral (terapia génica) y como reactivos de aglutinación de glóbulos rojos (inmuno diagnóstico), véase, por ejemplo Todorovska et al., *J. Immunol. Métodos*. 2001 01 de febrero; 248 (1-2): 47-66; Tomlinson et al., *Methods Enzymol.* 2000; 326: 461-79; McCall et al., *J. Immunol.* 2001 15 de mayo; 166 (10): 6112-7.

[0174] Los anticuerpos totalmente humanos se pueden preparar mediante la inmunización de ratones transgénicos que llevan grandes partes de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina humana. Estos ratones, los ejemplos de dichos ratones son el Xenomouse[®] (Abgenix, Inc.) (Patente de Estados Unidos Nos. 6.075.181 y 6.150.584), el HuMAb-Mouse[®] (Medarex, Inc./GenPharm) (patente de Estados Unidos 5.545.806 y 5.569.825), el TransChromo Mouse (Kirin) y el KM Mouse (Medarex/Kirin), son bien conocidos en la técnica.

[0175] Los anticuerpos pueden entonces prepararse mediante, por ejemplo, la técnica de hibridoma estándar o mediante expresión en fagos. Estos anticuerpos contendrán entonces solo secuencias de aminoácidos completamente humanas.

[0176] Los anticuerpos totalmente humanos también pueden generarse usando expresión en fagos a partir de bibliotecas humanas. La expresión en fagos puede realizarse usando métodos bien conocidos por el experto en la materia, como en Hoogenboom et al. y Marks et al. (HR Hoogenboom y Winter G. (1992) *J. Mol Biol* 227 (2): 381-8; Marcas JD et al (1991) *J. Mol Biol* 222 (3): 581-97, y también las Patentes de Estados Unidos 5.885.793 y 5.969.108).

Anticuerpos terapéuticos y usos

[0177] Las propiedades in vivo, en particular con respecto a la relación tumor: sangre y velocidad de depuración, de los miembros de unión específica de la invención serán al menos comparable con mAb806. Después de la administración a un sujeto humano o animal dicho miembro de unión específica mostrará un pico de la relación tumor:sangre de > 1:1. Preferiblemente en dicha relación, el miembro de unión específica también tendrá una relación de tumor:órgano mayor que 1:1, preferiblemente mayor que 2:1, más preferiblemente mayor que 5:1. Preferiblemente en dicha relación, el miembro de unión específica también tendrá una relación de órgano:sangre de <1:1 en órganos lejos del sitio del tumor. Estas relaciones excluyen órganos de catabolismo y la secreción del miembro de unión específica administrado. De este modo, en el caso de los scFv y Fab (como se muestra en los ejemplos adjuntos), los miembros de unión se secretan a través de los riñones y hay una mayor presencia aquí que en otros órganos. En el caso de las IgG completas, la depuración será, al menos en parte, a través del hígado. La relación de la localización de pico del anticuerpo intacto normalmente se logrará entre 10 y 200 horas después de la

administración del miembro de unión específica. Más particularmente, la relación puede medirse en un xenoinjerto de tumor de aproximadamente 0,2-1,0 g formado por vía subcutánea en un flanco de un ratón desnudo atómico.

5 **[0178]** Los anticuerpos de la invención pueden marcarse con un marcador detectable o funcional. Los marcadores detectables incluyen, pero no se limitan a, radiomarcadores tales como los isótopos ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{121}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{211}At , ^{198}Au , ^{67}Cu , ^{225}Ac , ^{213}Bi , ^{99}Tc y ^{186}Re , que pueden unirse a los anticuerpos de la invención utilizando química convencional conocida en la técnica de formación de imágenes de anticuerpos. Los marcadores también incluyen marcadores fluorescentes y marcadores utilizados convencionalmente en la técnica de obtención de imágenes por RM-CT. También incluyen marcadores enzimáticos
10 tales como peroxidasa de rábano picante. Los marcadores incluyen además restos químicos, tales como biotina, que pueden detectarse mediante la unión a un resto detectable afín específico, por ejemplo, avidina marcada.

15 **[0179]** Los marcadores funcionales incluyen sustancias que están diseñadas para reconocer el sitio de un tumor para causar la destrucción del tejido tumoral. Dichos marcadores funcionales incluyen fármacos citotóxicos, tales como 5-fluorouracilo o ricina y enzimas tales como carboxipeptidasa o nitrorreductasa bacteriana, que son capaces de convertir profármacos en fármacos activos en el sitio de un tumor.

20 **[0180]** También, los anticuerpos que incluyen tanto anticuerpos policlonales y monoclonales, y los fármacos que modulan la producción o la actividad de los miembros de unión, anticuerpos específicos y/o sus subunidades pueden poseer ciertas aplicaciones de diagnóstico y pueden utilizarse, por ejemplo, para el propósito de detectar y/o medir afecciones, tales como cáncer, lesiones precancerosas, afecciones relacionadas con o resultantes de crecimiento celular hiperproliferativo o similares. Por ejemplo, los miembros de unión específica, anticuerpos o sus subunidades se pueden usar para producir anticuerpos tanto policlonales como monoclonales para sí mismos en una variedad de medios celulares, mediante técnicas conocidas, tales como la técnica del hibridoma utilizando, por ejemplo, linfocitos
25 de bazo de ratón fusionados y células de mieloma. Asimismo, las pequeñas moléculas que imitan o antagonizan la actividad o actividades de los miembros de unión específica de la invención pueden descubrirse o sintetizarse y pueden ser utilizadas en los protocolos de diagnóstico y/o terapéuticos.

30 **[0181]** Los miembros de unión específica radiomarcados, es decir, anticuerpos y fragmentos de los mismos, son útiles en técnicas de diagnóstico in vitro y en técnicas de imágenes radiológicas in vivo y en radioinmunoterapia. En el caso de formación de imágenes in vivo, los miembros de unión específica de la presente invención pueden conjugarse con un agente de imagen en lugar de un radioisótopo o radioisótopos, incluyendo, pero sin limitación, agente potenciador de imagen de resonancia magnética, en el que por ejemplo una molécula de anticuerpo es cargada con un gran número de iones paramagnéticos a través de grupos quelantes. Ejemplos de grupos quelantes
35 incluyen EDTA, porfirinas, éteres corona de poliaminas y polioximas. Los ejemplos de iones paramagnéticos incluyen hierro, gadolinio, manganeso, renio, europio, lantano, holmio y erbio. En una realización adicional de la invención, los miembros de unión específica radiomarcados, es decir, anticuerpos y fragmentos de los mismos, particularmente radioinmunoconjugados, son útiles en radioinmunoterapia, particularmente como anticuerpos radiomarcados para la terapia del cáncer. En una realización adicional más, los miembros de unión específica
40 radiomarcados, es decir, anticuerpos y fragmentos de los mismos, son útiles en técnicas de cirugía guiada por radioinmunología, en el que se pueden identificar e indicar la presencia y/o localización de células cancerosas, células precancerosas, células tumorales, y células hiperproliferativas, antes, durante o después de la cirugía para eliminar dichas células.

45 **[0182]** Los inmunoconjugados o proteínas de fusión de anticuerpos de la presente invención, en el que los miembros de unión específica, es decir, anticuerpos y fragmentos de los mismos, de la presente invención están conjugados o unidos a otras moléculas o agentes incluyen además, pero sin limitación, miembros de unión conjugados a un agente de ablación química, toxina, inmunomodulador, citoquina, agente citotóxico, agente o fármaco quimioterapéutico.
50

[0183] La radioinmunoterapia (RAIT) ha entrado en la clínica y ha demostrado su eficacia utilizando varios inmunoconjugados de anticuerpos. El anticuerpo anti-antígeno carcinoembrionario (anti-CEA) humanizado hMN-14 marcado con ^{131}I ha sido evaluado en el cáncer colorrectal (Behr TM et al (2002) Cancer 94 (4Suppl): 1373-1381) y el mismo anticuerpo con el marcador ^{90}Y ha sido evaluado en el carcinoma de tiroides medular (Stein R et al (2002) Cancer 94 (1): 51-61). La radioinmunoterapia con anticuerpos monoclonales también ha sido evaluado y descrito para el linfoma no de Hodgkin y el cáncer de páncreas (Goldenberg DM (2001) Crit Rev. Oncol Hematol 39 (1-2): 195-201; Oro DV et al (2001) Crit. Rev. Oncol. Hematol. 39 (1-2) 147-54). Los métodos de radioinmunoterapia con anticuerpos particulares se describen también en las patentes de Estados Unidos Nos. 6.306.393 y 6.331.175. La cirugía radioinmuno guiada (RIGS) también ha entrado en la clínica y ha demostrado eficacia y utilidad, incluyendo el
55 uso de anticuerpos anti-CEA y anticuerpos dirigidos contra antígenos asociados a tumores (Kim JC et al (2002) J. Cancer Jut 97 (4): 542-7; Schneebaum, S. et al (2001) World J. Surg 25 (12): 1495-8; Avital, S. et al (2000) Cáncer 89 (8): 1692-8; McIntosh et al DG (1997) Cáncer Biother Radiopharm 12 (4): 287-94).
60

[0184] Los anticuerpos de la presente invención se pueden administrar a un paciente con necesidad de tratamiento a través de cualquier vía adecuada, generalmente por inyección en el torrente sanguíneo o CSF, o directamente en el sitio del tumor. La dosis precisa dependerá de un número de factores, incluyendo si el anticuerpo es para
65

diagnóstico o para tratamiento, el tamaño y la ubicación del tumor, la naturaleza precisa del anticuerpo (si todo el anticuerpo, fragmento, diacuerpo, etc), y la naturaleza del marcador detectable o funcional unido al anticuerpo. Cuando se utiliza un radionúcleo para la terapia, una dosis única máxima adecuada es de aproximadamente 45 mCi/m², hasta un máximo de aproximadamente 250 mCi/m². La dosis preferible está en el intervalo de 15 a 40 mCi, con un intervalo de dosificación más preferido de 20 a 30 mCi, o de 10 a 30 mCi. Dicha terapia puede requerir de sustitución de médula ósea o de células madre. Una dosis de anticuerpo típica, ya sea para imágenes de tumores o para tratamiento del tumor, estará en el intervalo de 0,5 a 40 mg, preferiblemente de 1 a 4 mg de anticuerpo en forma F(ab')₂. Los anticuerpos desnudos se administran preferiblemente en dosis de 20 a 1000 mg de proteína por dosis, o 20 a 500 mg de proteína por dosis, o 20 a 100 mg de proteína por dosis. Esta es una dosis para un solo tratamiento de un paciente adulto, que puede ajustarse proporcionalmente para niños y bebés, y también ajustarse para otros formatos de anticuerpo en proporción al peso molecular. Los tratamientos pueden repetirse a diario, dos veces por semana, intervalos semanales o mensuales, a discreción del médico.

[0185] Estas formulaciones pueden incluir una segunda proteína de unión, tal como proteínas de unión a EGFR descritas supra. En una forma especialmente preferida, esta segunda proteína de unión es un anticuerpo monoclonal, tal como 528 o 225, discutido infra.

Composiciones farmacéuticas y terapéuticas

[0186] Los miembros de unión específica de la presente invención normalmente se administrarán en forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además del miembro de unión específica.

[0187] Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas según la presente invención, y para utilizar según la presente invención, pueden comprender, además de principio activo, un excipiente, portador, tampón, estabilizador farmacéuticamente aceptables u otros materiales bien conocidos por los expertos en la técnica. Dichos materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del portador u otro material dependerá de la ruta de administración, que puede ser oral, o por inyección, por ejemplo intravenosa.

[0188] Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden estar en forma de comprimido, cápsula, polvo o líquido. Un comprimido puede comprender un portador sólido, tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas comprenden generalmente un portador líquido, tal como agua, vaselina, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Pueden incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacárido o glicoles, tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

[0189] Para inyección intravenosa, o inyección en el sitio afectado, el principio activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica son capaces de preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos, tales como inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de lactato de Ringer. Pueden incluirse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según sea necesario.

[0190] Una composición puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, agentes o sustancias terapéuticas, ya sea simultánea o secuencialmente dependiendo de la afección a ser tratada. Además, la presente invención contempla e incluye composiciones que comprenden el miembro de unión, es decir, anticuerpo o fragmento del mismo, descrito en este documento y otros agentes o sustancias terapéuticas, tales como agentes anti-cáncer o sustancias terapéuticas, hormonas, agentes anti-EGFR o anticuerpos, o moduladores inmunitarios. Más generalmente, estos agentes anti-cáncer pueden ser inhibidores de tirosina quinasa o inhibidores de la cascada de fosforilación, moduladores post-traduccionales, inhiidores del crecimiento o división celular (por ejemplo, antimitóticos), o inhibidores de la transducción de la señal. Otros tratamientos o terapias pueden incluir la administración de dosis adecuadas de medicamentos para aliviar el dolor, tales como fármacos no esteroides anti-inflamatorios (por ejemplo, aspirina, paracetamol, ibuprofeno o ketoprofeno) o los opiáceos, tales como la morfina o antieméticos. La composición se puede administrar en combinación (ya sea de forma secuencial (es decir, antes o después) o simultáneamente) con inhibidores de tirosina quinasa (incluyendo, pero sin limitación, AG1478 y ZD1839, STI571, OSI-774, SU-6668), doxorubicina, temozolomida, cisplatino, carboplatino, nitrosoureas, procarbazona, vincristina, hidroxurea, 5-fluorouracilo, arabinósido de citosina, ciclofosfamida, epipodofilotoxina, carmustina, lomustina, y/u otros agentes quimioterapéuticos. Por lo tanto, estos agentes pueden ser agentes anti-EGFR específicos, o inhibidores de la tirosina quinasa, tales como AG1478, ZD1839, STI571, OSI-774, o SU-6668 o pueden ser agentes anti-cáncer y agentes anti-neoplásicos más generales, tales como doxorubicina, cisplatino, temozolomida, nitrosoureas, procarbazona, vincristina, hidroxurea, 5-fluorouracilo, arabinósido de citosina, ciclofosfamida, epipodofilotoxina, carmustina o lomustina. Además, la composición se puede administrar con hormonas, tales como dexametasona, moduladores inmunes, tales como interleucinas, factor de necrosis tumoral (TNF) u otros factores de crecimiento o citoquinas que estimulan la respuesta inmune y la reducción o eliminación de las células cancerosas o tumores.

[0191] Un modulador inmune, tal como TNF, puede combinarse junto con un miembro de la invención en forma de un anticuerpo biespecífico que reconoce el epítipo de EGFR reconocido por los anticuerpos de la invención, así

como la unión a receptores de TNF. La composición también puede administrarse con, o puede incluir combinaciones junto con otros anticuerpos anti-EGFR, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos anti-EGFR 528, 225, SC-03, DR8.3, L8A4, Y10, ICR62 y ABX-EGF.

- 5 **[0192]** Anteriormente, el uso de agentes tales como doxorrubicina y cisplatino junto con anticuerpos anti-EGFR han producido una mayor actividad anti-tumoral (Fan et al, 1993; Baselga et al, 1993). La combinación de doxorrubicina y mAb 528 dio como resultado la erradicación total de xenoinjertos A431 establecidos, mientras que el tratamiento con cualquier agente solo causó sólo la inhibición temporal del crecimiento in vivo (Baselga et al, 1993). Del mismo modo, la combinación de cisplatino y, o bien mAb528 o 225, también condujo a la erradicación de xenoinjertos A431 bien establecidos, lo cual no se observó cuando se utilizó el tratamiento con cualquiera de los agentes (Fan et al, 1993).

Radioterapia convencional

- 15 **[0193]** Además, la presente invención contempla e incluye composiciones terapéuticas para el uso del miembro de unión en combinación con radioterapia convencional. Se ha indicado que el tratamiento con anticuerpos que reconocen receptores de EGF puede potenciar los efectos de la radioterapia convencional (Milas et al, Clin Cancer Res 2000 de febrero: 6 (2): 701, Huang et al, Clin Cancer Res 2000 Jun: 6 (6): 2166).

- 20 **[0194]** Como se ha demostrado en el presente documento, las combinaciones del miembro de unión de la presente descripción, es decir, un anticuerpo o fragmento del mismo, preferiblemente mAb806, ch806, mAb175, mAb124, mAb1133 o hu806 o un fragmento del mismo, y sustancias terapéuticas anti-cáncer, especialmente sustancias terapéuticas anti-EGFR, incluyendo otros anticuerpos anti-EGFR, demuestran una terapia eficaz, y en particular la sinergia, contra los tumores xenoinjertados. En los ejemplos, se demuestra, por ejemplo, que la combinación de AG 1478 y mAb806 da lugar a una reducción significativamente mejorada del volumen del tumor de xenoinjerto A431 en comparación con el tratamiento con cualquier agente solo. AG1478 (4- (3-cloroanilino)-6,7-dimetoxiquinazolina) es un inhibidor potente y selectivo de la quinasa del receptor de EGF y se describe particularmente en la Patente de Estados Unidos No. 5.457.105 (véase también, Liu, W. et al (1999) J. Cell Sci 112: 2409; Eguchi, S. et al (J. Biol Chem 273 1998): 8890; Lcvitsky, A. y Gazit, A. (1995) Science 267: 1782). Los ejemplos de la memoria demuestran además la sinergia terapéutica de anticuerpos de la presente descripción con otros anticuerpos anti-EGFR, particularmente con el anticuerpo anti-EGFR 528.

- 35 **[0195]** La presente invención contempla además composiciones terapéuticas útiles en la práctica de los métodos terapéuticos de esta descripción. Una composición terapéutica de la invención incluye, en mezcla, un excipiente (portador) farmacéuticamente aceptable y uno o más de un miembro de unión específica, análogo de polipéptido del mismo o fragmento del mismo, tal como se describe en el presente documento como principio activo. En una realización preferida, la composición comprende un antígeno capaz de modular la unión específica del presente miembro de unión/anticuerpo con una célula diana.

- 40 **[0196]** La preparación de composiciones terapéuticas que contienen polipéptidos, análogos o fragmentos activos como principios activos se entiende bien en la técnica. Habitualmente, dichas composiciones se preparan como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas. Sin embargo, también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección. La preparación también se puede emulsionar. El ingrediente terapéutico activo se mezcla a menudo con excipientes que son farmacéuticamente 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 menores de sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes del pH que mejoran la eficacia del principio activo.

- 50 **[0197]** Un polipéptido, análogo o fragmento activo puede formularse en la composición terapéutica como formas de sales farmacéuticamente aceptables neutralizadas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la molécula de polipéptido o anticuerpo) y que se forman con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos, tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas a partir de los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, o férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, y similares.

- 60 **[0198]** Las composiciones terapéuticas que contienen polipéptido, análogos o fragmentos activos se administran convencionalmente por vía intravenosa, como mediante inyección de una dosis unitaria, por ejemplo. El término "dosis unitaria" cuando se utiliza en referencia a una composición terapéutica de la presente invención 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 en asociación con el diluyente requerido; es decir, portador, o vehículo.

65

[0199] Las composiciones se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad a administrar depende del sujeto a tratar, capacidad del sistema inmune del sujeto para utilizar el principio activo, y el grado de capacidad de unión a EGFR deseado. Las cantidades precisas de principio activo requeridas para ser administradas dependen del juicio 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 vía de administración. Las pautas adecuadas para la administración y de refuerzo iniciales también son variables, pero están tipificados por una administración inicial seguida de dosis repetidas a intervalos de una o más horas por una inyección posterior u otra administración. Alternativamente, se contemplan la infusión intravenosa continua suficiente para mantener concentraciones de diez nanomolar a diez micromolar en la sangre.

[0200] Las composiciones farmacéuticas para administración oral pueden estar en forma de comprimido, cápsula, polvo o líquido. Un comprimido puede comprender un portador sólido, tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas comprenden generalmente un portador líquido, tal como agua, vaselina, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Pueden incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacárido o glicoles, tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

[0201] Para inyección intravenosa, o inyección en el sitio afectado, el principio activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está libre de pirógenos y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica son capaces de preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos, tales como inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de lactato de Ringer. Pueden incluirse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según sea necesario.

Ensayos de diagnóstico

[0202] La presente descripción también se refiere a una variedad de aplicaciones de diagnóstico, incluyendo los métodos para detectar la presencia de estímulos, tales como EGFR expresada aberrantemente, por referencia a su capacidad para ser reconocido por el presente miembro de unión específica. Como se mencionó anteriormente, el EGFR se puede utilizar para producir anticuerpos para sí mismo mediante una variedad de técnicas conocidas, y dichos anticuerpos podrían entonces aislarse y utilizarse como en las pruebas de la presencia de una actividad de EGFR particular en células diana sospechosas.

[0203] Las aplicaciones de diagnóstico de los miembros de unión específica de la presente invención, es decir, anticuerpos y fragmentos de los mismos, incluyen aplicaciones in vitro e in vivo bien conocidas y estándar para el experto en la materia y basadas en la presente descripción. Los ensayos de diagnóstico y kits para la evaluación in vitro y la evaluación del estado de EGFR, particularmente con respecto a la expresión aberrante de EGFR, se pueden utilizar para diagnosticar, evaluar y monitorear las muestras de pacientes, incluyendo aquellos conocidos por tener o que se sospecha que tienen cáncer, una afección precancerosa, una afección relacionada con el crecimiento celular hiperproliferativo o de una muestra de tumor. La valoración y la evaluación del estado de EGFR también es útil para determinar la idoneidad de un paciente para un ensayo clínico de un fármaco o para la administración de un agente quimioterapéutico o miembro de unión específica particular, es decir, un anticuerpo, de la presente invención, incluyendo combinaciones de los mismos, frente a un agente o miembro de unión diferente. Este tipo de monitorización y evaluación de diagnóstico ya está en práctica la utilización de anticuerpos contra la proteína HER2 en cáncer de mama (prueba Hercep, Dako Corporation), donde también se usa el ensayo para evaluar a los pacientes para la terapia de anticuerpo utilizando Herceptin. Las aplicaciones in vivo incluyen imágenes de los tumores o la evaluación del estado del cáncer de individuos, incluyendo radioimágenes.

[0204] Como se ha sugerido anteriormente, el método de diagnóstico de la presente descripción comprende examinar una muestra celular o medio mediante un ensayo que incluye una cantidad eficaz de un antagonista para un EGFR/proteína, tal como un anticuerpo anti-EFGR, preferiblemente un anticuerpo policlonal purificado por afinidad, y más preferiblemente un mAb. Además, es preferible que las moléculas de anticuerpo anti-EFGR utilizadas en el presente documento estén en forma de partes Fab, Fab', F(ab')₂ o F(v) o moléculas de anticuerpo completas. Como se discutió previamente, los pacientes capaces de beneficiarse de este método incluyen aquellos que sufren de cáncer, una lesión precancerosa, una infección viral, patologías que implican o resultantes de crecimiento celular hiperproliferativo u otro trastorno patológico. Los métodos para aislar EFGR e inducir anticuerpos anti-EFGR y para determinar y optimizar la capacidad de los anticuerpos anti-EFGR para ayudar en el examen de células diana son todos bien conocidos en la técnica.

[0205] Preferiblemente, el anticuerpo anti-EFGR usado en los métodos de diagnóstico de esta descripción es un anticuerpo policlonal purificado por afinidad. Más preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal (mAb). Además, las moléculas de anticuerpo anti-EFGR utilizadas en el presente documento pueden estar en forma de partes Fab, Fab', F(ab')₂ o F(v) de moléculas de anticuerpo completas.

[0206] Como se describe en detalle anteriormente, el anticuerpo o anticuerpos para el EGFR puede producirse y aislarse mediante métodos estándar, incluyendo las técnicas de hibridoma bien conocidas. Por conveniencia, el

anticuerpo o anticuerpos para la EGFR se referirán en el presente documento como Ab₁ y el anticuerpo o anticuerpos desarrollados en otra especie como Ab₂.

[0207] La presencia de EGFR en las células puede determinarse mediante procedimientos inmunológicos habituales in vitro o in vivo aplicables a dichas determinaciones. Se conoce un número de procedimientos útiles. Tres de dichos procedimientos que son especialmente útiles utilizan el EGFR marcado con un marcador detectable, anticuerpo Ab₁ marcado con un marcador detectable, o anticuerpo Ab₂ marcado con un marcador detectable. Los procedimientos pueden resumirse mediante las siguientes ecuaciones en las que el asterisco indica que la partícula está marcada, y "R" representa el EGFR:

- A. $R^* + Ab_1 = R^*Ab_1$
 B. $R^* + Ab^* = R^*Ab_1^*$
 C. $R + Ab_1 + Ab_2^* = RAb_1Ab_2^*$

[0208] Los procedimientos y su aplicación son todos familiares para los expertos en la técnica y en consecuencia se pueden utilizar dentro del alcance de la presente invención. El procedimiento "competitivo", Procedimiento A, se describe en la Patente de Estados Unidos Nos. 3.654.090 y 3.850.752. El procedimiento C, el procedimiento de "sandwich", se describe en las Patentes US Nos. RE 31.006 y 4.016.043. Todavía otros procedimientos son conocidos, tales como el procedimiento de "doble anticuerpo" o "DASP".

[0209] En cada caso anterior, el EGFR forma complejos con uno o más anticuerpos o parejas de unión y un miembro del complejo está marcado con un marcador detectable. El hecho de que haya formado un complejo y, si lo desea, la cantidad del mismo, se puede determinar por métodos conocidos aplicables a la detección de marcadores.

[0210] Se observará de lo anterior que una propiedad característica de Ab₂ es que reaccionará con Ab₁. Esto se debe a que se ha utilizado Ab₁ desarrollado en una especie de mamífero en otras especies como antígeno para desarrollar el anticuerpo Ab₂. Por ejemplo, Ab₂ se puede desarrollar en cabras utilizando anticuerpos de conejo como antígenos. Ab₂, por lo tanto, sería anticuerpo anti-conejo desarrollado en cabras. Para los propósitos de esta descripción y las reivindicaciones, Ab₁ se referirá como un anticuerpo primario o anti-EGFR, y Ab₂ se referirá como un anticuerpo anti-Ab₁ o secundario.

[0211] Los marcadores más empleados habitualmente para estos estudios son elementos radiactivos, enzimas, productos químicos que emiten fluorescencia cuando se exponen a la luz ultravioleta, y otros.

[0212] Un número de materiales fluorescentes son conocidos y se puede utilizar como marcadores. Éstos incluyen, por ejemplo, fluoresceína, rodamina, auramina, rojo de Texas, azul AMCA y Amarillo Lucifer. Un material de detección particular es anticuerpo anti-conejo preparado en cabras y conjugado con fluoresceína a través de un isotiocianato.

[0213] El EGFR o su pareja o parejas de unión como el presente miembro de unión específica, también puede ser marcarse con un elemento radioactivo o con una enzima. El marcador radioactivo puede detectarse por cualquiera de los procedimientos de recuento disponibles actualmente. El isótopo preferido puede seleccionarse de entre ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ³⁶Cl, ⁵¹Cr, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵⁹Fe, ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹¹¹In, ²¹¹At, ¹⁹⁸At, ⁶⁷Cu, ²²⁵Ac, ²¹³Bi, y ⁹⁹Tc y ¹⁸⁶Re.

[0214] Los marcadores enzimáticos son asimismo útiles, y pueden detectarse por cualquiera de las técnicas colorimétrica, espectrofotométrica, fluoroespectrofotométricas, amperométricas o gasométricas actualmente utilizadas. La enzima se conjuga con la partícula seleccionada mediante reacción con moléculas puente, tales como carbodiimidias, diisocianatos, glutaraldehído y similares. Muchas enzimas que pueden utilizarse en estos procedimientos son conocidas y pueden ser utilizadas. Las preferidas son peroxidasa, beta-glucuronidasa, beta-D-glucosidasa, beta-D-galactosidasa, ureasa, glucosa oxidasa más peroxidasa y fosfatasa alcalina. Las patentes de Estados Unidos n° 3.654.090; 3.850.752; y 4.016.043 se refieren a modo de ejemplo por su descripción de material de marcaje alternativo y métodos.

[0215] Un sistema de ensayo particular que puede ser utilizado ventajosamente según la presente invención, es conocido como un ensayo de receptor. En un ensayo de receptor, el material a ensayar como el miembro de unión específica, se marca apropiadamente y después ciertas colonias de prueba celulares se inoculan con una cantidad de material marcado y no marcado, después de lo cual se llevan a cabo estudios de unión para determinar la medida en que el material marcado se une a los receptores celulares. De esta manera, pueden comprobarse las diferencias en afinidad entre materiales.

[0216] Por consiguiente, una cantidad purificada del miembro de unión específica puede radiomarcarse y combinarse, por ejemplo, con anticuerpos u otros inhibidores de los mismos, después de lo cual se llevarían a cabo estudios de unión. Las soluciones entonces se prepararían para contener diversas cantidades de miembro de unión específica no combinado marcado y no marcado, y las muestras de células se inocularían entonces y se incubarían a partir de entonces. Las monocapas de células resultantes se lavan a continuación, se solubilizan y a continuación se cuentan en un contador gamma durante una longitud de tiempo suficiente para producir un error estándar de

<5%. Estos datos se someten a análisis de Scatchard después de lo cual se pueden sacar las observaciones y conclusiones con respecto a la actividad del material. Aunque lo anterior es de ejemplo, ilustra la manera en la que un ensayo del receptor se puede realizar y utilizar, en el caso en que la capacidad de unión celular del material ensayado puede servir como una característica distintiva.

5 **[0217]** Un ensayo útil y contemplado según la presente invención se conoce como un ensayo "cis/trans". Brevemente, este ensayo emplea dos construcciones genéticas, una de las cuales es habitualmente un plásmido que expresa continuamente un receptor particular de interés cuando se transfecta en 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
10 complejo receptor/ligando. Así, por ejemplo, si se desea evaluar un compuesto como un ligando para un receptor particular, uno de los plásmidos sería una construcción que da lugar a la expresión del receptor en la línea celular elegida, mientras que el segundo plásmido poseería un promotor unido al gen de luciferasa en el que se inserta el elemento de respuesta al receptor particular. Si el compuesto bajo prueba es un agonista para el receptor, el ligando formará un complejo con el receptor, y el complejo resultante se unirá al elemento de respuesta e iniciará la
15 transcripción del gen de luciferasa. A continuación, se mide fotométricamente la quimioluminiscencia resultante, y se obtienen curvas de dosis-respuesta y se compararon con la de ligandos conocidos. El protocolo precedente se describe en detalle en la patente de Estados Unidos No. 4.981.784 y la Publicación Internacional PCT No. WO 88/03168, a cuyo propósito se refiere el experto.

20 **[0218]** En una realización adicional de esta invención, pueden prepararse kits de prueba comerciales adecuados para su uso por un médico especialista para determinar la presencia o ausencia de la expresión aberrante de EGFR, incluyendo pero no limitado a EGFR amplificado y/o una mutación de EGFR, en células diana sospechosas. Según las técnicas de ensayo descritas anteriormente, una clase de dichos kits contendrá por lo menos el EGFR marcado o su pareja de unión, por ejemplo, un anticuerpo específico para el mismo, y las instrucciones, por supuesto,
25 dependiendo del método seleccionado, por ejemplo, "competitivo", "sándwich", "DASP" y similares. Los kits también pueden contener reactivos periféricos tales como tampones, estabilizadores, etc.

[0219] Por consiguiente, se puede preparar un equipo de prueba para la demostración de la presencia o la capacidad de las células para la expresión aberrante o modificación posterior a la traducción de EGFR, que
30 comprende:
(a) una cantidad predeterminada de al menos un componente reactivo inmunológicamente marcado obtenido mediante la unión directa o indirecta del presente miembro de unión específica o una pareja de unión específica al mismo, a un marcador detectable;
(b) otros reactivos; y
35 (c) instrucciones de uso de dicho kit.

[0220] Más específicamente, el kit de prueba de diagnóstico puede comprender:
(a) una cantidad conocida del miembro de unión específica como se describe anteriormente (o una pareja de unión) generalmente unido a una fase sólida para formar un inmunosorbente, o como alternativa, unido a una etiqueta
40 adecuada, o dichos productos finales plurales, etc. (o sus parejas de unión), uno de cada uno;
(b) si es necesario, otros reactivos; y
(c) instrucciones de uso de dicho kit de prueba.

[0221] En una variación adicional, el kit de prueba se puede preparar y utilizar para las objetivos indicados anteriormente, que funciona según un protocolo predeterminado (por ejemplo, "competitivo", "sándwich", "doble anticuerpo", etc.), y comprende:
(a) un componente marcado que ha sido obtenido mediante el acoplamiento del miembro de unión específica a un
45 marcador detectable;
(b) uno o más reactivos inmunológicos adicionales de los cuales al menos un reactivo es un ligando o un ligando inmovilizado, cuyo ligando se selecciona del grupo que consiste en:
50 (i) un ligando capaz de unirse con el componente marcado (a);
(ii) un ligando capaz de unirse con una pareja de unión del componente marcado (a);
(iii) un ligando capaz de unirse con al menos uno de los componentes a determinar; y
(iv) un ligando capaz de unirse con al menos una de las parejas de unión de al menos uno de los componentes a
55 determinar; e
(c) instrucciones para la realización de un protocolo para la detección y/o determinación de uno o más componentes de una reacción inmunológica entre el EFGR, el miembro de unión específica, y una pareja de unión específica al mismo.

60 **[0222]** Según lo anterior, puede prepararse un sistema de ensayo para el cribado de potenciales fármacos eficaces para modular la actividad del EFGR, la expresión aberrante o modificación post-traduccional del EGFR, y/o la actividad o unión del miembro de unión específica. El receptor o el miembro de unión pueden introducirse en un sistema de prueba, y el fármaco prospectivo también puede introducirse en el cultivo celular resultante, y el cultivo se examina a continuación para observar cualquier cambio en la actividad de la fase S de las células, ya sea debido a
65 la adición del fármaco prospectivo solo, o debido al efecto de las cantidades añadidas del agente o agentes conocidos.

Ácidos Nucleicos

- 5 [0223] La presente descripción proporciona además un ácido nucleico aislado que codifica un miembro de unión específica de la presente invención. El ácido nucleico incluye ADN y ARN. En un ejemplo preferido, la presente descripción proporciona un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención como se define anteriormente, incluyendo un polipéptido tal como se establece como los residuos de CDR de las cadenas VH y VL de los anticuerpos de la invención.
- 10 [0224] La presente descripción también proporciona construcciones en forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o expresión que comprenden al menos un polinucleótido como anteriormente.
- 15 [0225] La presente invención también proporciona una célula huésped recombinante que comprende una o más construcciones como anteriormente. Un ácido nucleico que codifica cualquier miembro de unión específica tal como se proporciona por sí mismo forma un ejemplo de la presente descripción, al igual que un método de producción del miembro de unión específica, cuyo método comprende la expresión a partir de ácido nucleico que codifica para el mismo. La expresión puede conseguirse convenientemente cultivando en condiciones apropiadas células huésped recombinantes que contienen el ácido nucleico. Después de la producción mediante la expresión, un miembro de unión específica puede aislarse y/o purificarse utilizando cualquier técnica adecuada, a continuación se utiliza según sea apropiado.
- 20 [0226] Los miembros de unión específica y moléculas de ácido nucleico codificante y vectores según la presente invención pueden proporcionarse aislados y/o purificados, por ejemplo, de su entorno natural, en forma sustancialmente pura u homogénea, o, en el caso del ácido nucleico, libre o sustancialmente libre de ácido nucleico o genes de origen distinto de la secuencia que codifica un polipéptido con la función requerida. El ácido nucleico según la presente puede comprender ADN o ARN y puede ser total o parcialmente sintético.
- 25 [0227] Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de diferentes células huésped son bien conocidos. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, levaduras y sistemas de baculovirus. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino, células HeLa, células de riñón de hámster bebé, células de melanoma de ratón NSO y muchas otras. Un huésped bacteriano común preferido es *E. coli*.
- 30 [0228] La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos en células procariotas, tales como *E. coli*, está bien establecida en la técnica. Para una revisión, véase por ejemplo Pluckthun, A. *Bio/Technology* 9: 545-551 (1991). La expresión en células eucariotas en cultivo también está disponible para los expertos en la técnica como una opción para la producción de un miembro de unión específica, para revisiones recientes véase, por ejemplo Raff, ME (1993) *Curr. Dictamen Biotech.* 4: 573-576; Trill JJ et al. (1995) *Curr. Dictamen Biotech* 6: 553-560.
- 35 [0229] Los vectores adecuados se pueden elegir o construir, conteniendo secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos, por ejemplo, virales, por ejemplo, fagos, o fagémido, según sea apropiado. Para más detalles, véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 2ª edición, Sambrook et al, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 40 Muchas técnicas conocidas y protocolos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen en detalle en *Short Protocols in Molecular Biology*, Segunda Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992.
- 45 [0230] Por lo tanto, un aspecto adicional de la presente invención proporciona una célula huésped que contiene ácido nucleico como se describe aquí. Un ejemplo adicional proporciona un método que comprende introducir dicho ácido nucleico en una célula huésped. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para las células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción usando retrovirus u otros virus, por ejemplo vaccinia o, para células de insectos, baculovirus. Para las células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación con cloruro de calcio, electroporación y transfección usando bacteriófagos.
- 50 [0231] La introducción puede ir seguida de causar o permitir la expresión a partir del ácido nucleico, por ejemplo mediante el cultivo de células huésped en condiciones para la expresión del gen.
- 55 [0232] En una realización, el ácido nucleico de la descripción se integra en el genoma (por ejemplo cromosoma) de la célula huésped. La integración puede ser inducida por la inclusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma, según técnicas estándar.
- 60

[0233] La presente descripción también proporciona un método que comprende utilizar una construcción como se ha indicado anteriormente en un sistema de expresión con el fin de expresar un miembro de unión específica o polipéptido como anteriormente.

5 [0234] Como se ha indicado anteriormente, la presente descripción también se refiere a una molécula de ADN recombinante o gen clonado, o una variante degenerada de la misma, que codifica un miembro de unión específica, es decir, anticuerpo o un fragmento del mismo, que posee una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NOS: 2 y 4; 129 y 134; 22 y 27; 32 y 37; y/o 42 y 47, preferiblemente una molécula de ácido nucleico, en particular una
10 molécula de ADN recombinante o gen clonado, que codifica el miembro de unión o anticuerpo, que tiene una secuencia de nucleótidos o es complementaria a una secuencia de ADN que codifica uno de dichas secuencias.

[0235] Otra característica de esta descripción es la expresión de las secuencias de ADN descritas en este documento. Como es bien conocido en la técnica, las secuencias de ADN pueden expresarse uniéndolas operativamente a una secuencia de control de la expresión en un vector de expresión apropiado y empleando ese
15 vector de expresión para transformar un huésped unicelular apropiado.

[0236] Dicha unión operativa de una secuencia de ADN de esta descripción a una secuencia de control de la expresión, por supuesto, incluye, si no es ya parte de la secuencia de ADN, la disposición de un codón de iniciación, ATG, en el marco de lectura correcto en dirección 5' de la secuencia de ADN.
20

[0237] Puede emplearse una amplia variedad de combinaciones de huésped/vector de expresión en la expresión de las secuencias de ADN de esta descripción. Los vectores de expresión útiles, por ejemplo, pueden consistir en segmentos de secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintéticas. Los vectores adecuados incluyen derivados de SV40 y plásmidos bacterianos conocidos, por ejemplo, plásmidos de *E. coli* col EI, pCR1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos tales como RP4; ADNs de fago, por ejemplo, los numerosos derivados del fago X, por ejemplo, NM989, y otro ADN de fago, por ejemplo, M13 y ADN de fago monocatenario filamentosos; plásmidos de levadura, tales como el plásmido 2u o derivados del mismo; vectores útiles en células eucariotas, tales como vectores útiles en células de insecto o de mamífero; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos, tales como plásmidos que han sido modificados para emplear ADN de fago u otras secuencias de control de la expresión; y similares.
25
30

[0238] Puede utilizarse cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de la expresión, secuencias que controlan la expresión de una secuencia de ADN unida operativamente a la misma, en estos vectores para expresar las secuencias de ADN de esta descripción. Dichas secuencias de control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores tempranos o tardíos de SV40, CMV, vaccinia, polioma o adenovirus, el sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema *TAC*, el sistema *TRC*, el sistema *LTR*, el operador principal y regiones promotoras del fago λ , las regiones de control de la proteína de recubrimiento fd, el promotor para la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, los promotores de la fosfatasa ácida (por ejemplo, Pho5), los promotores de los factores de apareamiento de levadura, y otras secuencias conocidas para controlar la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus, y diversas combinaciones de los mismos.
35
40

[0239] Una amplia variedad de células huésped unicelulares son también útiles en la expresión de las secuencias de ADN de esta descripción. 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 CHO, YB/20, NSO, SP2/0, RI.I, células 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 de tejidos.
45

[0240] Se entenderá que no todos los vectores, secuencias de control de expresión y huéspedes funcionarán igualmente bien para expresar las secuencias de ADN de esta descripción. Ni 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 adecuados, secuencias de control de la expresión, y huéspedes sin experimentación indebida para realizar la expresión deseada sin apartarse del alcance de esta descripción. Por ejemplo, en la selección de un vector, el huésped debe considerarse porque el vector debe funcionar en él. El número de copias del vector, la capacidad de controlar el número de copias, y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tales como marcadores de antibióticos, también serán considerados.
50
55

[0241] En la selección de una secuencia de control de expresión, se considerará normalmente una variedad de factores. Estos incluyen, por ejemplo, la fuerza relativa del sistema, su controlabilidad, y su compatibilidad con la secuencia particular de ADN o gen a expresar, particularmente en lo que se refiere a las potenciales estructuras secundarias. Los huéspedes unicelulares adecuados serán seleccionados mediante la consideración de, por ejemplo, su compatibilidad con el vector elegido, sus características de secreción, su capacidad para plegar proteínas correctamente, y sus requerimientos de fermentación, así como la toxicidad para el huésped del producto codificado por las secuencias de ADN a expresar, y la facilidad de purificación de los productos de expresión.
60
65

[0242] Teniendo en cuenta 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 descripción sobre la fermentación o en cultivo animal a gran escala.

5 [0243] Se pretende además que se puede preparar análogos del miembro de unión específica a partir de secuencias de nucleótidos del complejo de proteína/subunidad derivada dentro del alcance de la presente descripción. Los análogos, tales como fragmentos, pueden producirse, por ejemplo, por digestión con pepsina de material del miembro de unión específica. Otros análogos, tales como muteínas, pueden producirse mediante mutagénesis dirigida al sitio estándar de secuencias codificantes del miembro de unión específica. Los análogos que muestran
10 "actividad del miembro de unión específica", tales como pequeñas moléculas, si funcionan como promotores o inhibidores, pueden ser identificados mediante ensayos in vivo y/o in vitro conocidos.

[0244] Como se mencionó anteriormente, se puede preparar sintéticamente en lugar de clonarse una secuencia de ADN que codifica un miembro de unión específica. La secuencia de ADN puede diseñarse con los codones apropiados para la secuencia de aminoácidos del miembro de unión específica. En general, se seleccionarán los codones preferidos para el huésped previsto si la secuencia se utilizará para expresión. La secuencia completa se ensambla a partir de oligonucleótidos preparados por métodos estándar y se ensamblan en una secuencia codificante completa. Véase, por ejemplo, Edge, Nature, 292: 756 (1981); Nambair et al, Science, 223: 1299 (1984); Jay et al., J. Biol. Chem., 259: 6311 (1984).
15
20

[0245] Las secuencias de ADN sintéticas permiten la construcción conveniente de genes que expresarán análogos del miembro de unión específica o "muteínas". Alternativamente, el ADN que codifica muteínas puede producirse por mutagénesis dirigida al sitio de genes de ADNc de miembro de unión específica nativa, y las muteínas se pueden producir directamente utilizando síntesis convencional de polipéptidos.
25

[0246] Un método general para la incorporación específica de sitio de aminoácidos no naturales en proteínas se describe en Christopher J. Noren, Spencer J. Anthony-Cahill, Michael C. Griffith, Peter G. Schultz, Science, 244: 182-188 (abril de 1989). Este método puede utilizarse para crear análogos con aminoácidos no naturales.
30

[0247] La presente descripción se extiende a la preparación de oligonucleótidos antisentido y ribozimas que pueden utilizarse para interferir con la expresión del EGFR a nivel traduccional. Este enfoque utiliza ácido nucleico antisentido y ribozimas para bloquear la traducción de un ARNm específico, ya sea enmascarando ese ARNm con un ácido nucleico antisentido o escindiéndolo con una ribozima.
35

[0248] Los ácidos nucleicos antisentido son moléculas de ADN o ARN que son complementarias a al menos una parte de una molécula de ARNm específica (véase Weintraub, 1990; Marcus-Sekura, 1988.). En la célula, se hibridan con ese ARNm, formando una molécula de doble cadena. La célula no traduce un ARNm en esta forma de doble cadena. Por lo tanto, los ácidos nucleicos antisentido interfieren con la expresión de ARNm en proteína. Los oligómeros de aproximadamente quince nucleótidos y moléculas que hibridan con el codón de iniciación AUG serán particularmente eficientes, ya que son fáciles de sintetizar y es probable que presenten menos problemas que las moléculas más grandes cuando se introducen en células productoras. Se han utilizado métodos antisentido para inhibir la expresión de muchos genes in vitro (Marcus-Sekura, 1988; Hambor et al., 1988).
40

[0249] Las ribozimas son moléculas de ARN que poseen la capacidad de escindir específicamente otras moléculas de ARN de cadena sencilla de una manera algo análoga a las endonucleasas de restricción de ADN. Las ribozimas se descubrieron a partir de la observación de que ciertos ARNm tienen la capacidad de escindir sus propios intrones. Mediante la modificación de la secuencia de nucleótidos de estos ARN, los investigadores han sido capaces de diseñar moléculas que reconocen secuencias de nucleótidos específicas en una molécula de ARN y escindirla (Cech, 1988.). Debido a que son específicas de secuencia, sólo se inactivan los ARNm con secuencias particulares.
45
50

[0250] Los investigadores han identificado dos tipos de ribozimas, tipo Tetrahymena y de tipo "cabeza de martillo" (Hasselhoff y Gerlach, 1988). Las ribozimas de tipo Tetrahymena reconocen secuencias de cuatro bases, mientras que del tipo "cabeza de martillo" reconocen secuencias de once a dieciocho bases. Cuanto más larga es la secuencia de reconocimiento, más probable es que se produzca exclusivamente en las especies de ARNm diana. Por lo tanto, las ribozimas de tipo cabeza de martillo son preferibles a las ribozimas de tipo Tetrahymena para inactivar una especie de ARNm específica, y secuencias de reconocimiento de dieciocho bases son preferibles a secuencias de reconocimiento más cortas.
55

[0251] Las secuencias de ADN descritas en este documento pueden utilizarse de este modo para preparar moléculas antisentido contra, y ribozimas que escinden ARNm para EFGR y sus ligandos.
60

[0252] La invención se puede entender mejor por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes, que se proporcionan como ejemplos de la invención. Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar más completamente las realizaciones preferidas de la invención y no deben en ningún modo interpretarse, sin embargo, como limitativos del amplio alcance de la invención.
65

Ejemplo 1Generación y aislamiento de anticuerpos5 Líneas celulares

[0253] Para los análisis de inmunización y especificidad, se utilizaron varias líneas celulares, nativas o transfectadas con el gen normal de tipo salvaje o "wtEGFR" o el gen Δ EGFR que lleva la mutación por delección Δ 2-7: línea celular murina de fibroblastos NR6, NR6 Δ EGFR (transfectada con Δ EGFR) y NR6_{wtEGFR} (transfectada con wtEGFR), línea de células de glioblastoma humano U87MG (que expresan bajos niveles de wtEGFR endógeno), U87MG_{wtEGFR} (transfectada con wtEGFR), U87MG Δ EGFR (transfectada con Δ EGFR) , y la línea celular de carcinoma de células escamosas humano A431 (que expresa altos niveles de wtEGFR).

[0254] Para los análisis de la inmunización y la especificidad, se utilizaron varias líneas celulares, nativas o transfectadas con el gen normal de tipo salvaje o "wtEGFR" o el gen Δ EGFR que lleva de2-7 o la mutación por delección Δ 2-7: línea celular murina de fibroblastos NR6, NR6 Δ EGFR (transfectada con Δ EGFR) y NR6_{wtEGFR} (transfectada con wtEGFR), línea de células de glioblastoma humano U87MG (que expresan bajos niveles de wtEGFR endógeno), U87MG_{wtEGFR} o "U87MG.wtEGFR" (transfectada con wtEGFR), U87MG Δ EGFR o "U87MG. Δ 2-7" (transfectada con Δ EGFR), y la línea celular de carcinoma de células escamosas humano A431 (que expresa altos niveles de wtEGFR). Las líneas celulares NR6, NR6 Δ EGFR y NR6_{wtEGFR} fueron descritas anteriormente (Batra et al. (1995) Epidermal Growth Factor Ligand-independent, Unregulated, Cell-Transforming Potential of a Naturally Occurring Human Mutant EGFRvIII Gene. Cell Growth Differ. 6 (10): 1251-59). La línea de células NR6 carece EGFR endógeno normal. (Batra et al., 1995). Las líneas y transfecciones celulares U87MG fueron descritas anteriormente (Nishikawa et al. (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 7727-7.731).

[0255] La línea de células astrocitoma U87MG (Ponten, J. y Macintyre, EH (1968) Long term culture of normal and neoplastic human glia. Acta. Pathol. Microbiol. Scand. 74, 465-86) que expresa endógenamente bajos niveles de wtEGFR, estaba infectada con un retrovirus que contiene el EGFR de2-7 para producir la línea celular U87MG. Δ 2-7 (Nishikawa et al., 1994). La línea de células transfectadas U87MG.wtEGFR fue producida como se describe en Nagane et al. (1996) Cancer Res. 56, 5079-5086. Mientras que las células U87MG expresan aproximadamente 1×10^5 EGFR, las células U87MG.wtEGFR expresan aproximadamente 1×10^6 EGFR, y por lo tanto imitan la situación observada con la amplificación del gen. La línea de células pro-B murina BaF/3, que no expresa ninguna molécula relacionada con EGFR conocida, también se transfectó con EGFR de2-7 dando lugar a la línea celular BaF/3 Δ 2-7 (Luwor et al (2004) The tumor-specific de2-7 epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes cells survival and heterodimerizes with the wild-type EGFR. Oncogene 23: 6.095-6.104). Las células de carcinoma escamoso A431 humano se obtuvieron a partir de ATCC (Rockville, MD). La línea celular de carcinoma epidermoide A431 se ha descrito previamente (Sato et al. (1987) Derivation and assay of biological effects of monoclonal antibodies to epidermal growth factor receptors. Methods Enzymol. 146, 63-81).

[0256] Todas las líneas celulares se cultivaron en DMEM/F-12 con GlutaMAX[®] (Life Technologies, Inc., Melbourne, Australia y Grand Island, NY) suplementado con 10% de FCS (CSL, Melbourne, Australia); 2 mM glutamina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), y penicilina/estreptomina (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY). Además, las líneas celulares U87MG. Δ 2-7 y U87MG.wtEGFR se mantuvieron en 400 mg/ml de geneticina (Life Technologies, Inc., Melbourne, Victoria, Australia). Las líneas celulares se cultivaron a 37°C en una atmósfera no modificada de 5% CO₂.

Reactivos

[0257] El péptido de empalme único EGFR de2-7 tiene la secuencia de aminoácidos: LEEKKGNYVVTDH (SEQ ID NO: 13). Los péptidos de empalme único biotinilados (biotina-LEEKKGNYVVTDH (SEQ ID NO: 5) y LEEKKGNYVVTDH-Biotina (SEQ ID NO: 6)) de EGFR de2-7 se sintetizaron mediante química Fmoc estándar y la pureza (> 96%) se determinó por HPLC de fase inversa y análisis espectral de masas (Auspep, Melbourne, Australia).

Anticuerpos utilizados en los estudios

[0258] Con el fin de comparar nuestros resultados con otros reactivos, se incluyeron anticuerpos monoclonales adicionales en nuestros estudios. Estos reactivos fueron mAb528 para wtEGFR (Sato et al. (1983) Mol. Biol. Med. 1 (5), 511-529) y DH8.3, que se generó contra un péptido sintético que abarca la secuencia de unión de la mutación por delección Δ 2-7 EGFR. El anticuerpo DH8.3 (IgG1), que es específico para el EGFR de2-7, se ha descrito previamente (Hills et al. (1995) Specific targeting of a mutant, activated EGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody. Int. J. Cancer 63, 537-43,1995) y se obtuvo después de la inmunización de ratones con el péptido de empalme único que se encuentra en EGFR de2-7 (Hills et al., 1995).

[0259] El anticuerpo 528, que reconoce tanto EGFR de2-7 como de tipo salvaje, ha sido descrito previamente (Masui et al. (1984) Growth Inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. Cancer Res. 44, 1002-7) y fue producido en el Biological Production Facility, Instituto Ludwig para la Investigación del Cáncer (Melbourne, Australia) utilizando un hibridoma (ATCC HB-8509) obtenido de la American Type Culture Collection (Rockville, MD). El anticuerpo policlonal SC-03 es un anticuerpo policlonal de conejo purificado por afinidad generado contra un péptido carboxi terminal del EGFR (Santa Cruz Biotechnology Inc.).

Generación de anticuerpos

[0260] La línea de fibroblastos murinos NR6 Δ EGFR se utilizó como inmunógeno. Se generaron hibridomas de ratón mediante la inmunización de ratones BALB/c por vía subcutánea cinco veces a intervalos de 2 a 3 semanas, con 5×10^5 - 2×10^6 células en adyuvante. Se utilizó adyuvante completo de Freund para la primera inyección. A partir de entonces, se utilizó adyuvante incompleto de Freund (Difco[®], Voigt Global Distribution, Lawrence, KS). Las células de bazo de ratones inmunizados se fusionaron con línea celular de mieloma de ratón SP2/0 (Shulman et al (1978), Nature 276: 269- 270). Los sobrenadantes de los clones recién generados se cribaron en ensayos de hemoadsorción por la reactividad con línea celular NR6, NR6_{wEGFR} y NR6 Δ EGFR y a continuación se analizaron mediante ensayos de hemoadsorción con líneas celulares de glioblastoma humano U87MG, U87MG_{wEGFR} y U87 Δ EGFR. Los sobrenadantes del hibridoma seleccionado se analizaron posteriormente por transferencia Western y se analizaron adicionalmente por inmunohistoquímica. Se purificaron los mAbs recién obtenidos que muestran el patrón de reactividad esperado.

[0261] Se establecieron cinco hibridomas y se seleccionaron inicialmente tres clones, 124 (IgG2a), 806 (IgG2b), y 1133 (IgG2a) para la caracterización adicional basada en titulación elevada (1:2500) con NR6 Δ EGFR y una fondo bajo en células NR6 y NR6_{wEGFR} en el ensayo de hemaglutinación roseta. Un cuarto clon, 175 (IgG2a), se caracterizó posteriormente y se discute por separado en el Ejemplo 23 a continuación. En un análisis de hemaglutinación posterior, estos anticuerpos no mostraron reactividad (sobrenadante sin diluir \leq 10%) con la línea celular de glioblastoma humano nativo U87MG y U87MG_{wEGFR}, pero eran fuertemente reactivos con U87MG Δ EGFR; menos reactividad se observó con A431. Por el contrario, en el análisis de FACS, 806 no fue reactivo con U87MG nativo y tiñó intensamente U87MG Δ EGFR y en menor grado U87MG_{wEGFR} lo que indica la unión de 806 a ambos, Δ EGFR y wtEGFR (ver abajo).

[0262] En los ensayos de transferencia Western, se analizaron a continuación mAb124, mAb806 y mAb1133 por la reactividad con wtEGFR y Δ EGFR. Los lisados por detergente se extrajeron de NR6 Δ EGFR, U87MG Δ EGFR, así como de A431. Los tres mAbs mostraron un patrón de reactividad similar con lisados de células que tiñen tanto la proteína wtEGFR (170 kDa) como la proteína Δ EGFR (140 kDa). Como reactivo de referencia, mAbR.I. conocido por ser reactivo con el wtEGFR (Waterfield et al (1982) J. Cell Biochem. 20 (2), 149-161.) se utilizó en lugar de mAb528, que se sabe que es no reactivo en análisis de transferencia Western. mAbR.I. mostró reactividad con tipo salvaje y Δ EGFR. Los tres clones recién generados mostraron reactividad con Δ EGFR y menos intensa con wtEGFR. DH8.3 fue únicamente positivo en el lisado de U87MG Δ EGFR y NR6 Δ EGFR.

[0263] El análisis inmunohistoquímico de los clones 124, 806 y 1133, así como mAb528 y mAbDH8.3 en tumores de xenoinjertos U87MG, U87MG Δ EGFR y A431 se muestran en la Tabla 1. Todos los mAb mostraron una fuerte tinción de xenoinjerto U87MG Δ EGFR. Sólo mAb528 mostró reactividad débil en el xenoinjerto U87MG nativo. En xenoinjertos A431, mAb528 mostró fuerte reactividad homogénea. mAb124, mAb806 y mAb1133 revelaron una reactividad con la mayoría de las células basales localizadas del carcinoma de células escamosas de A431 y no reaccionaron con las capas de células superiores o el componente queratinizante. DH8.3 fue negativo en xenoinjertos A431.

Tabla 1
Análisis inmunohistoquímico de anticuerpos 528, DH8.3 y 124, 806 y 1133

Anticuerpo	Xenoinjerto Δ U87MG Δ EGFR	Xenoinjerto A431	Xenoinjerto U87MG (nativo)
mAb528	Pos.	Pos.	Pos. (tinción focal)
mAb124	Pos.	Pos. (predominantemente células basales)	-
mAb806	Pos.	Pos. (predominantemente células basales)	-
mAb1133	Pos.	Pos. (predominantemente células basales)	-
DH8.3	Pos.	-	-

Tinción estromal menor debido a a detección de anticuerpos de ratón endógenos

Secuenciación

[0264] Las cadenas pesada variable (VH) y ligera variable (VL) de mAb806, mAb124 y mAb1133 se secuenciaron, y sus regiones determinantes de complementariedad (CDRs) se identificaron de la siguiente manera:

mAb806

[0265] Cadena VH de mAb806: la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 1) y secuencia de aminoácidos, con el péptido señal (SEQ ID NO: 2) se muestran en las figuras 14A y 14B, respectivamente (péptido señal subrayados en la figura 14B). Las regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2, y CDR3 (SEQ ID NOS: 15, 16, y 17, respectivamente) se indican mediante subrayado en la Figura 16. La secuencia de aminoácidos de la cadena VH de mAb806 sin su péptido señal (SEQ ID NO: 11) se muestra en la Figura 16.

[0266] Cadena VL de mAb806: secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 3) y secuencia de aminoácidos, con el péptido señal (SEQ ID NO: 4) se muestran en las figuras 15A y 15B, respectivamente (péptido señal subrayados en la figura 15B). Las regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2, y CDR3 (SEQ ID NOS: 18, 19, y 20, respectivamente) se indican mediante subrayado en la figura 17. La secuencia de aminoácidos de la cadena VL de mAb806 sin su péptido señal (SEQ ID NO: 12) se muestra en la figura 17.

mAb124

[0267] Cadena VH de mAb124: secuencias de ácido nucleico (SEQ ID NO: 21) y de aminoácidos (SEQ ID NO: 22) se muestran en las figuras 51A y 51B, respectivamente. Las regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2, y CDR3 (SEQ ID NOS: 23, 24, y 25, respectivamente) se indican mediante subrayado.

[0268] Cadena VL de mAb124: secuencias de ácido nucleico (SEQ ID NO: 26) y de aminoácidos (SEQ ID NO: 27) se muestran en las figuras 51C y 51D, respectivamente. Las regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2, y CDR3 (SEQ ID NOS: 28, 29, y 30, respectivamente) se indican mediante subrayado.

mAb1133

[0269] Cadena VH de mAb1133: secuencias de ácido nucleico (SEQ ID NO: 31) y de aminoácidos (SEQ ID NO: 32) se muestran en las figuras 52A y 52B, respectivamente. Las regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2, y CDR3 (SEQ ID NOS: 33, 34, y 35, respectivamente) se indican mediante subrayado.

[0270] Cadena VL de mAb1133: secuencias de ácido nucleico (SEQ ID NO: 36) y de aminoácidos (SEQ ID NO: 37) se muestran en las figuras 52C y 52D, respectivamente. Las regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2, y CDR3 (SEQ ID NOS: 38, 39, y 40, respectivamente) se indican mediante subrayado.

Ejemplo 2

Unión de anticuerpos a líneas celulares mediante FACS

[0271] Se seleccionó inicialmente mAb806 para una caracterización adicional, tal como se establece en el presente documento y en los siguientes Ejemplos. mAb124 y mAb1133 también fueron seleccionados para caracterización adicional, tal como se discute en el Ejemplo 26 a continuación, y se encontró que tenían propiedades correspondientes a las propiedades únicas de mAb806 discutidas en el presente documento.

[0272] Con el fin de determinar la especificidad de mAb806, se analizó su unión a células U87MG, U87MG.Δ2-7 y U87MG.wtEGFR mediante la clasificación de células activadas por flujo (FACS). Brevemente, las células se marcaron con el anticuerpo pertinente (10 µg/ml), seguido por IgG de cabra anti-ratón conjugado con fluoresceína (dilución 1:100; Calbiochem San Diego, CA, EE.UU.; Becton-Dickinson PharMingen, San Diego, CA, EE.UU.) tal como se describe previamente (Nishikawa et al., 1994). Los datos de FACS se obtuvieron en un Coulter Epics Elite ESP mediante la observación de un mínimo de 5.000 eventos y se analizaron utilizando EXPO (versión 2) para Windows. Una IgG2b irrelevante se incluyó como un control de isotipo para mAb806 y el anticuerpo 528 fue incluido, ya que reconoce tanto de2-7 como wtEGFR.

[0273] Solamente el anticuerpo 528 fue capaz de teñir la línea celular U87MG parental (figura 1) consistente con los informes anteriores que demuestran que estas células expresan el wtEGFR (Nishikawa et al, 1994). mAb806 y DH8.3 tenían niveles de unión similares al anticuerpo de control, demostrando claramente que no son capaces de unirse al receptor de tipo salvaje (figura 1). La unión del anticuerpo de control de isotipo a células U87MG.Δ 2-7 y U87MG.wtEGFR fue similar a la observada para las células U87MG.

[0274] mAb806 tiñó células U87MG.Δ2-7 y U87MG.wtEGFR, lo que indica que mAb806 reconoce específicamente el EGFR de2-7 y EGFR amplificado (figura 1). El anticuerpo DH8.3 tiñó células U87MG.Δ2-7, confirmando que el anticuerpo DH8.3 reconoce específicamente el EGFR de2-7 (figura 1). Como era de esperar, el anticuerpo 528 tiñó tanto las líneas celulares U87MG.Δ 2-7 como U87MG.wtEGFR (figura 1). Como era de esperar, el anticuerpo 528

tiñó U87MG.Δ2-7 con una intensidad superior a las células parentales, ya que se une a receptores de2-7 y de tipo salvaje que se coexpresan en estas células (figura 1). Se obtuvieron resultados similares utilizando una hemoadsorción mixta de proteína A que detecta IgG unida a superficie por la aparición de proteína A recubierta con glóbulos rojos humanos (grupo O) a células diana. El anticuerpo monoclonal 806 fue reactivo con células U87MG.Δ2-7, pero no mostró reactividad significativa (sobrenadante sin diluir menos de 10%) con U87MG que expresa EGFR de tipo salvaje. Es importante destacar que mAb806 también se unió a la línea celular BaF/3.Δ2-7, lo que demuestra que la co-expresión de wtEGFR no es un requisito para la reactividad de mAb806 (figura 1).

Ejemplo 3

Unión de los anticuerpos en ensayos

[0275] Para caracterizar adicionalmente la especificidad de los anticuerpos mAb806 y DH8.3, se examinó su unión mediante ELISA. Se utilizaron dos tipos de ELISA para determinar la especificidad de los anticuerpos. En el primer ensayo, las placas fueron recubiertas con sEGFR (10 µg/ml en tampón de carbonato 0,1 M pH 9,2) durante 2 h y después se bloquearon con albúmina de suero humano (HSA) al 2% en PBS. sEGFR es el dominio extracelular recombinante (aminoácidos 1-621) del EGFR de tipo salvaje, y fue producido tal como se ha descrito previamente (Domagala et al. (2000) Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between Epidermal Growth Factor (EGF) and the Extracellular Domain of the EGF Receptor. Growth Factors. 18, 11-29). Los anticuerpos se añadieron a los pocillos por triplicado a una concentración creciente en HSA al 2% en solución salina tamponada con fosfato (PBS). El anticuerpo unido se detectó por IgG de oveja anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante (Silenus, Melbourne, Australia) utilizando ABTS (Sigma, Sydney, Australia) como sustrato y la absorbancia medida a 405 nm.

[0276] Tanto el anticuerpo mAb806 como el anticuerpo 528 mostraron curvas de unión dependiente de la dosis y saturante a sEGFR de tipo salvaje inmovilizado (figura 2A). Como el péptido de empalme único que se encuentra en el EGFR de2-7 no está contenido dentro del sEGFR, mAb806 debe unirse a un epítipo localizado dentro de la secuencia de EGFR de tipo salvaje. La unión del anticuerpo 528 fue menor que la observada para mAb806, probablemente porque reconoce un determinante conformacional. Como se esperaba, el anticuerpo DH8.3 no se unía al sEGFR de tipo salvaje incluso a concentraciones de hasta 10 µg/ml (Figura 2A). Aunque sEGFR en solución inhibió la unión del anticuerpo 528 a sEGFR inmovilizado de una manera dependiente de la dosis, era incapaz de inhibir la unión de mAb806 (Figura 2B). Esto sugiere que mAb806 sólo puede unirse a EGFR de tipo salvaje una vez inmovilizado en placas de ELISA, un proceso que puede inducir cambios conformacionales. Se observaron resultados similares utilizando un BIAcore mediante el cual mAb806 se unió a sEGFR inmovilizado pero mAb806 inmovilizado no era capaz de unirse a sEGFR en solución (figura 2C).

[0277] Después de la desnaturalización por calentamiento durante 10 min a 95°C, sEGFR en solución fue capaz de inhibir la unión de mAb806 a sEGFR inmovilizado (figura 2C), confirmando que mAb806 puede unirse a EGFR de tipo salvaje bajo ciertas condiciones. Curiosamente, el sEGFR desnaturalizado fue incapaz de inhibir la unión del anticuerpo 528 (figura 2C), lo que demuestra que este anticuerpo reconoce un epítipo conformacional. El anticuerpo DH8.3 mostró una unión dependiente de la dosis y saturable al único péptido EGFR de2-7 (figura 2D). Ni el anticuerpo mAb806 ni el anticuerpo 528 se unieron al péptido, incluso a concentraciones superiores a las utilizados para obtener la unión de saturación de DH8.3, indicando además que mAb806 no reconoce un determinante epítipo dentro de este péptido.

[0278] En el segundo ensayo, el péptido de2-7 específico biotinilado (biotina LEEKKGNVVDH (SEQ ID NO: 5)) se unió a placas de ELISA previamente recubiertas con estreptavidina (Pierce, Rockford, Illinois). Los anticuerpos se unieron y se detectaron como en el primer ensayo. Ni el anticuerpo mAb806 ni el anticuerpo 528 se unieron al péptido, incluso a concentraciones superiores a las utilizadas para obtener la unión de saturación de DH8.3, indicando además que mAb806 no reconoce un determinante epítipo dentro de este péptido.

[0279] Para demostrar adicionalmente que mAb806 reconoce un epítipo distinto del péptido de empalme, se realizaron experimentos adicionales. Se utilizó el péptido de2-7 C-terminal biotinilado (LEEKKGNVVDH-Biotina (SEQ ID NO: 6)) en los estudios con mAb806 y mAbL8A4, generados contra el péptido de2-7 (Reist et al (1995) Cancer Res 55 (19), 4375-4382; Foulon et al (2000) Cancer Res 60 (16), 4453-4460).

Reactivos utilizados en los estudios de péptidos

[0280]

- Péptido de empalme: LEEKKGNVVDH-OH (Biosource, Camarillo, CA);
 - Péptido C: LEEKKGNVVDH (K-Biot) -OH (Biosource, Camarillo, CA);
 - sEGFR: dominio extracelular soluble recombinante derivado de células CHO (aminoácidos 1-621) del EGFR de tipo salvaje (LICR Melbourne);
 - mAb806: anticuerpo monoclonal de ratón, IgG_{2b} (LICR NYB);
 - mAbL8A4: anticuerpo monoclonal de ratón, IgG₁ (Duke University);

- IgG₁ mAb de control de isotipo;
- IgG_{2b} mAb de control de isotipo;

5 [0281] El péptido C se inmovilizó sobre un chip microsensor de estreptavidina a una densidad superficial de 350RU (+/- 30RU). Se ensayaron diluciones en serie de mAb para determinar la reactividad con el péptido. Se llevaron a cabo experimentos de bloqueo utilizando péptido no biotinilado para evaluar la especificidad.

10 [0282] mAbL8A4 mostró una fuerte reactividad con el Péptido C incluso a bajas concentraciones de anticuerpo (6,25 nm) (figura 2E). mAb806 no mostró reactividad detectable específica con Péptido C hasta concentraciones de anticuerpo de 100 nM (concentración más alta probada) (figuras 2E y 2F). Se esperaba que mAbL8A4 reaccionara con Péptido C debido a que el péptido se utilizó como inmunógeno en la generación de mAbL8A4. La adición del péptido de empalme (no biotinilado, 50 µg/ml) bloquea completamente la reactividad de mAbL8A4 con Péptido C, lo que confirma la especificidad del anticuerpo para el epítipo del péptido de empalme.

15 [0283] En una segunda serie de experimentos de BIAcore, sEGFR se inmovilizó sobre un chip microsensor CM a una densidad superficial de ~ 4000RU. Se ensayaron diluciones en serie de mAb para determinar la reactividad con sEGFR.

20 [0284] mAb806 era fuertemente reactiva con sEGFR desnaturalizado, mientras que mAbL8A4 no reaccionó con sEGFR desnaturalizado. La reactividad de mAb806 con sEGFR desnaturalizado disminuye con la disminución de las concentraciones de anticuerpos. Se esperaba que mAbL8A4 no reaccionara con sEGFR porque mAbL8A4 se generó usando el péptido de empalme como el inmunógeno y sEGFR no contiene el péptido de empalme.

25 [0285] También se realizaron experimentos de tinción inmunológica con transferencia de puntos. Se pusieron puntos de diluciones en serie de péptido en 0,5 µl sobre un PVDF o membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con BSA al 2% en PBS, y a continuación se sonaron con anticuerpos 806, L8A4, DH8.3 y de control. Los anticuerpos L8A4 y DH8.3 se unieron al péptido sobre las membranas (datos no mostrados). mAb806 no se unió al péptido a concentraciones en las que L8A4 mostró claramente la unión (datos no mostrados). Los anticuerpos de control también fueron negativos para la unión a péptidos.

30 [0286] mAb806 se unió al wtEGFR en los lisados celulares después de inmunotransferencia (resultados no mostrados). Esto es diferente de los resultados obtenidos con el anticuerpo DH8.3, que reaccionó con EGFR de2-7 pero no wtEGFR. Por lo tanto, mAb806 puede reconocer el wtEGFR después de la desnaturalización pero no cuando el receptor está en su estado natural en la superficie celular.

35 Ejemplo 4

Análisis Scatchard

40 [0287] Se realizó un análisis Scatchard usando células U87MG.Δ2-7 después de la corrección para la inmunorreactividad con el fin de determinar la afinidad relativa de cada anticuerpo. Los anticuerpos se marcaron con ¹²⁵I (Amrad, Melbourne, Australia) por el método de la cloramina T y se determinó la inmunorreactividad mediante el ensayo Lindmo (Lindmo et al. (1984) Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. J. Immunol. Methods. 72, 77-89).

45 [0288] Todos los ensayos de unión se realizaron en HSA al 1%/PBS en 1-2 X 10⁶ células U87MG.Δ2-7 o A431 vivas durante 90 min a 4°C con rotación suave. Se utilizó una concentración de grupo de 10 ng/ml de anticuerpo marcado con ¹²⁵I en presencia de concentraciones crecientes del anticuerpo no marcado apropiado. La unión no específica se determinó en presencia de un exceso de 10.000 veces de anticuerpo no marcado. Ni mAb806 radiomarcado con ¹²⁵I o el anticuerpo DH8.3 se unieron a células U87MG parentales. Después de completar la incubación, las células se lavaron y se contó el anticuerpo marcado con ¹²⁵I utilizando un contador gamma COBRA II (Packard Instrument Company, Meriden, CT, EE.UU.).

50 [0289] Tanto el anticuerpo mAb806 como el anticuerpo DH8.3 mantuvieron una alta inmunorreactividad cuando se yodaron y era habitualmente mayor que el 90% para mAb806 y del 45-50% para el anticuerpo DH8.3. mAb806 tenía una afinidad por el receptor EGFR de2-7 de 1,1 X 10⁹ M⁻¹, mientras que la afinidad de DH8.3 era unas 10 veces inferior a 1,0 X 10⁸ M⁻¹. Ni el anticuerpo yodado se unió a células U87MG parentales. mAb806 reconoció un promedio de 2,4 X 10⁵ sitios de unión por célula, uniéndose el anticuerpo DH8.3 con un promedio de 5,2 X 10⁵ sitios. Por lo tanto, no sólo hubo buen acuerdo en el número de receptores entre los anticuerpos, sino también con un informe anterior que mostraba 2,5 X 10⁵ receptores de2-7 por célula medida por un anticuerpo específico de EGFR de2-7 diferente en la misma línea celular (Reist et al. (1997) Improved targeting of an anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody in tumor xenografts after labeling using labeling using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. Cancer Res. 57, 1510-5).

65 Ejemplo 5

Internalización de anticuerpos por células U87MG.Δ2-7

[0290] La tasa de internalización de anticuerpos después de la unión a una célula diana influye tanto en sus propiedades de reconocimiento tumorales como en las opciones terapéuticas. En consecuencia, los inventores examinaron la internalización de mAb806 y el anticuerpo DH8.3 después de la unión a células U87MG.Δ2-7 por FACS. Las células U87MG.Δ2-7 se incubaron con mAb806 o el anticuerpo DH8.3 (10 µg/ml) durante 1 h en DMEM a 4°C. Después del lavado, las células se transfirieron a DMEM precalentado a 37°C y se tomaron alícuotas en varios puntos de tiempo tras la incubación a 37°C. La internalización se detuvo lavando inmediatamente las alícuotas en tampón de lavado enfriado con hielo (1% de HSA/PBS). Al término del transcurso del tiempo, las células se tiñeron mediante FACS como se describe anteriormente. El porcentaje de internalización se calculó comparando la tinción de anticuerpos en superficie en diversos puntos de tiempo hasta tiempo cero utilizando la fórmula: porcentaje de anticuerpo internalizado = (fluorescencia promedio a tiempo x - fluorescencia de base)/(fluorescencia promedio a tiempo 0 - fluorescencia de base) X 100. Este método fue validado en un ensayo usando un anticuerpo yodado (mAb806) para medir la internalización como se ha descrito anteriormente (Huang et al. (1997) The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. J. Biol. Chem. 272, 2927-35). Las diferencias en la tasa de internalización en diferentes puntos temporales se compararon mediante la prueba t de Student. A lo largo de esta investigación, se analizaron los datos para la significación de la prueba t de Student, con excepción de los ensayos de supervivencia in vivo, que fueron analizados por análisis de Wilcoxon.

[0291] Ambos anticuerpos mostraron internalización relativamente rápida alcanzando niveles de estado estacionario a 10 min para mAb806 y 30 min para DH8.3 (figura 3). La internalización de DH8.3 fue significativamente mayor tanto en términos de tasa (80,5% de DH8.3 internalizado a los 10 min en comparación con 36,8% para mAb806, p <0,01) como de la cantidad total internalizada a los 60 min (93,5% frente a 30,4%, p <0,001). mAb806 mostró niveles ligeramente inferiores de internalización a los 30 y 60 min en comparación con los 20 min en los 4 ensayos realizados (figura 3). Este resultado también se confirmó utilizando un ensayo de internalización basado en mAb806 yodado (datos no mostrados).

Ejemplo 6Análisis por Microscopía Electrónica de Internalización de Anticuerpos

[0292] Teniendo en cuenta la diferencia antes mencionada en las tasas de internalización entre los anticuerpos, se realizó un análisis detallado del tráfico intracelular de anticuerpos usando microscopía electrónica.

[0293] Se cultivaron células U87MG.Δ2-7 células fueron cultivadas en portaobjetos de cámara recubiertos con gelatina (Nunc, Naperville, IL) hasta un 80% de confluencia y después se lavaron con DMEM frío en hielo. Las células fueron incubadas con mAb806 o el anticuerpo DH8.3 en DMEM durante 45 min a 4°C. Después del lavado, las células se incubaron durante 30 min con IgG anti-ratón (partículas de 20 nm) conjugadas con oro (BBInternational, Cardiff, UK) a 4°C. Después de un lavado adicional, se añadió DMEM precalentado/10% PCS a las células, se incubaron a 37°C durante diversos tiempos desde 1 hasta 60 min. La internalización del anticuerpo se detuvo mediante medios enfriados en hielo y las células se fijaron con glutaraldehído al 2,5% en PBS/0,1% de HSA y a continuación se postfijaron en tetróxido de osmio al 2,5%. Después de la deshidratación a través de una serie graduada de acetona, las muestras fueron embebidas en resina Epon/Araldite, se cortaron como secciones ultrafinas con un micrótomos Reichert Ultracut-S (Leica) y se recogieron en rejillas de níquel. Las secciones se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo antes de observarse en un microscopio electrónico de transmisión Philips CM 12 a 80 kV. Se realizó un análisis estadístico de los granos de oro contenidos en pozos recubiertos mediante una prueba de Chi-cuadrado.

[0294] Mientras que el anticuerpo DH8.3 se internalizó predominantemente a través pozos recubiertos, mAb806 parecía interiorizarse por macropinocitosis (Figura 19). De hecho, un análisis detallado de 32 pozos recubiertos formados en las células incubadas con mAb806 reveló que ninguna de ellas contenía anticuerpo. En cambio, alrededor del 20% de todos los pozos recubiertos a partir de las células incubadas con DH8.3 fueron positivas para el anticuerpo, con un número que contiene múltiples granos de oro. Un análisis estadístico del número total de granos de oro contenidos dentro de pozos recubiertos encontró que la diferencia fue altamente significativa (p <0,01). Después de 20-30 min ambos anticuerpos podían verse en las estructuras que se asemejan morfológicamente a los lisosomas (figura 19C). La presencia de restos celulares dentro de estas estructuras también fue consistente con su naturaleza de lisosoma.

Ejemplo 7Biodistribución de anticuerpos en ratones desnudos portadores de tumor

[0295] La biodistribución de mAb806 y el anticuerpo DH8.3 se comparó en ratones desnudos que contienen xenoinjertos U87MG por un lado y xenoinjertos U87MG.Δ 2-7 por el otro. Se eligió un período relativamente corto de tiempo para este estudio ya que un informe anterior demostró que el anticuerpo DH8.3 muestra los niveles máximos

de reconocimiento de tumor entre 4-24 h (Hills et al. (1995) Specific targeting of a mutant, activated EGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody. *Int. J. Cancer* 63, 537-43).

[0296] Se establecieron xenoinjertos de tumores en ratones desnudos BALB/c mediante inyección sc de 3×10^6 células U87MG, U87MG.Δ2-7 o A431. La expresión de EGFR de2-7 en xenoinjertos U87MG. Δ 2-7 se mantuvo estable durante todo el período de biodistribución medida por inmunohistoquímica en varios puntos de tiempo (datos no mostrados). Las células A431 retuvieron su reactividad a mAb806 cuando se cultivan como xenoinjertos tumorales tal como se determina por inmunohistoquímica. Las células U87MG o A431 se inyectaron en un lado de 7-10 días antes de que se inyectaron las células U87MG.Δ2-7 en el otro lado debido a la tasa de crecimiento más rápido observado para los xenoinjertos que expresan de2-7 EGFR. Los anticuerpos se radiomarcaron y evaluaron para la inmunoreactividad tal como se describe anteriormente y se inyectaron en ratones por la ruta retro-orbital cuando los tumores tenían 100-200 mg en peso. Cada ratón recibió dos anticuerpos diferentes (2 μg por anticuerpo): 2 μCi de mAb806 marcado con ^{125}I y 2 μCi de DH8.3 o 528 marcado con ^{131}I . Salvo que se indique, los grupos de 5 ratones se sacrificaron a diversos puntos de tiempo después de la inyección y se obtuvo sangre por punción cardiaca. Los tumores, hígado, bazo, riñones y pulmones se obtuvieron por disección. Todos los tejidos se pesaron y se ensayó la actividad de ^{125}I y ^{131}I utilizando un recuento de doble canal Window. Los datos se expresaron para cada anticuerpo como % ID/g de tumor determinado por comparación con los patrones de dosis inyectadas o convertido en relaciones de tumor en sangre/hígado (es decir, % ID/g de tumor dividido por % ID/g en la sangre o el hígado). Las diferencias entre grupos se analizaron mediante la prueba t de Student. Después de la inyección de mAb806 radiomarcado, algunos tumores se fijaron en formalina, se embebieron en parafina, se cortaron en secciones de 5 μm y a continuación se expusieron a película de rayos X (AGFA, Mortsel, Bélgica) para determinar la localización de anticuerpos por autorradiografía.

[0297] En términos de % ID/g de tumor, mAb806 alcanzó su nivel máximo en xenoinjertos de U87MG.Δ2-7 de 18,6% m/g de tumor a las 8 h (figura 4A), considerablemente más altos que cualquier otro tejido, excepto sangre. Aunque DH8.3 también mostró niveles tumorales máximos a las 8 h, el nivel era estadísticamente inferior ($p < 0,001$) 8,8% m/g de tumor en comparación con mAb806 (Figura 4B). Los niveles de ambos anticuerpos disminuyeron lentamente a las 24 y 48 h. La autorradiografía de secciones de tejido de xenoinjertos de U87MG.Δ2-7 recogidas 8 horas después de la inyección con mAb806 solo marcado con ^{125}I , ilustra claramente la localización de anticuerpos para tumor viable (Figura 20). Ningún anticuerpo mostró el reconocimiento específico de xenoinjertos parentales de U87MG (Figuras 4A y 4B). Con respecto a las relaciones de tumor a sangre/hígado, mAb806 mostró la mayor proporción en 24 h tanto para sangre (relación de 1,3) e hígado (relación de 6,1) (figuras 5A y 5B). El anticuerpo DH8.3 obtuvo su relación más alta en sangre a las 8 h (relación de 0,38) y a las 24 h en el hígado (relación de 1,5) (figuras 5A y 5B), ambos son considerablemente más bajos que los valores obtenidos para mAb806.

[0298] Como se describió anteriormente, los niveles de mAb806 en el tumor alcanzaron su punto máximo a las 8 horas. Aunque este pico es relativamente temprano en comparación con muchos anticuerpos que reconocen tumores, es completamente consistente con otros estudios que utilizan anticuerpos específicos de EGFR de2-7 que muestran todos picos a las 4-24 horas después de la inyección cuando se utiliza una dosis similar de anticuerpos (Hills et al., 1995; Reist et al., 1997; Reist et al (1996) Radioiodination of internalizing monoclonal antibodies using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. *Cancer Res* 56, 4970-7). En efecto, a diferencia de los informes anteriores, el punto de tiempo de 8 h se incluyó en el supuesto de que el reconocimiento del anticuerpo aumentaría rápidamente. El % ID/g de tumor observado con mAb806 fue similar al descrito para otros anticuerpos específicos de EGFR de2-7 cuando se utilizan técnicas de yodación estándar (Hills et al., 1995; Huang et al, 1997; Reist et al (1995) Tumor-specific antidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibodies: use of the tyramine-cellobiose radioiodination method enhances cellular retention and uptake in tumor xenografts. *Cancer Res* 55, 4375-82).

[0299] La razón para el pico temprano es probablemente el doble. En primer lugar, los tumores que expresan el EGFR de2-7, incluyendo las células U87MG transfectadas, crecen extremadamente rápido como xenoinjertos tumorales. Por lo tanto, incluso durante el período relativamente corto de tiempo utilizado en estos estudios de biodistribución, el tamaño del tumor aumenta hasta tal punto (5-10 veces de incremento en la masa durante 4 días) que el % ID/g de tumor se reduce en comparación con tumores de crecimiento lento. En segundo lugar, aunque la internalización de mAb806 fue relativamente lenta en comparación con DH8.3, todavía es rápida con respecto a muchos otros sistemas de anticuerpo/antígeno de tumor. Los anticuerpos internalizados experimentan una proteólisis rápida con los productos de degradación que se excretan de la célula (Press et al. (1990) Inhibition of catabolism of radiolabeled antibodies by tumor cells using lysosomotropic amines and carboxylic ionophores. *Cancer Res.* 50, 1243-1250). Este proceso de internalización, degradación y excreción reduce la cantidad de anticuerpo yodado retenido dentro de la célula. En consecuencia, los anticuerpos de internalización muestran niveles más bajos de reconocimiento que sus homólogos sin internalización. Los datos de microscopía electrónica registrados en el presente documento muestran que el mAb806 internalizado se transporta rápidamente a los lisosomas donde tiene lugar presumiblemente una degradación rápida. Esta observación es consistente con la expulsión rápida de yodo de la célula.

[0300] El anticuerpo monoclonal L8A4 descrito previamente dirigido al péptido de empalme único que se encuentra en el EGFR de2-7, se comporta de una manera similar a mAb806 (Reist et al. (1997) In vitro and in vivo behavior of

radiolabeled chimeric anti-EGFRvIII monoclonal antibody: comparison with its murine parent. Nucl Med Biol 24, 639-47). Utilizando células U87MG transfectadas con el EGFR de2-7, este anticuerpo tuvo una tasa de internalización similar (35% en 1 hora en comparación con 30% en 1 hora para mAb806) y mostró un reconocimiento comparable in vivo cuando se utilizan fibroblastos 3T3 transfectados con EGFR de2-7 (pico de 24% ID/g de tumor a las 24 horas en comparación con 18% ID/g de tumor a las 8 horas para mAb806) (Reist et al. (1997) Improved targeting of an anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody in tumor xenografts after labeling using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. Cancer Res. 57, 1510-5).

[0301] Curiosamente, la retención in vivo de este anticuerpo en xenoinjertos de tumor se mejoró cuando se marcaron con carboxilato de N-succinimidil 5-yodo-3-piridina (Reist et al., 1997). Este grupo prostético marcado está cargado positivamente a pH lisosómico y por lo tanto ha mejorado la retención celular (Reist et al. (1996) Radioiodination of internalizing monoclonal antibodies using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate. Cancer Res. 56, 4970-7). La retención mejorada es potencialmente útil cuando se considera un anticuerpo para radioinmunoterapia y este método podría ser utilizado para mejorar la retención de mAb806 yodado o sus fragmentos.

Ejemplo 8

Unión de mAb806 a células que contienen EGFR amplificado

[0302] Para examinar si mAb806 podría reconocer el EGFR expresado en células que contienen un gen receptor amplificado, se analizó su unión a células A431. Como se ha descrito anteriormente, las células A431 son células de carcinoma epidermoide humano y expresan altos niveles de wtEGFR. La unión baja, pero altamente reproducible, de mAb806 a las células A431 se observó por análisis FACS (figura 6). El anticuerpo DH8.3 no se unió a las células A431, lo que indica que la unión de mAb806 no fue el resultado del bajo nivel de expresión de EGFR de2-7 (figura 6). Como se esperaba, el anticuerpo anti-EGFR 528 mostró una fuerte tinción de las células A431 (figura 6). Teniendo en cuenta este resultado, la unión de mAb806 a A431 se caracterizó por análisis de Scatchard. Aunque la unión de mAb806 yodado fue comparativamente bajo, fue posible obtener datos consistentes para Scatchard. El promedio de tres de dichos experimentos produjo un valor para la afinidad de $9,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ con $2,4 \times 10^5$ receptores por célula. Por lo tanto, la afinidad para este receptor fue unas 10 veces menor que la afinidad por el EGFR de2-7. Además, mAb806 parece reconocer solamente una pequeña porción de EGFR encontrada en la superficie de las células A431. El anticuerpo 528 midió aproximadamente 2×10^6 receptores por célula que está de acuerdo con otros numerosos estudios (Santon et al. (1986) Effects of epidermal growth factor receptor concentration on tumorigenicity of A431 cells in nude mice. Cancer Res. 46, 4701-5).

[0303] Para asegurar que estos resultados no se limitan simplemente a la línea celular A431, se examinó la reactividad de mAb806 en otras 2 líneas de células que muestran la amplificación del gen EGFR. Tanto la línea celular de cabeza y cuello HN5 (Kwok TT y Sutherland RM (1991) Differences in EGF related radiosensitisation of human squamous carcinoma cells with high and low numbers of EGF receptors. Br. J. Cancer 64, 251-4) y la línea celular de cáncer de mama MDA-468 (Filmus et al. (1985) MDA-468, a human breast cancer cell line with a high number of epidermal growth factor (EGF) receptors, has an amplified EGF receptor gene and is growth inhibited by EGF. Biochem. Biophys. Res. Commun. 128, 898-905) han sido descritos por contener múltiples copias del gen EGFR. De acuerdo con estos informes, el anticuerpo 528 muestra una intensa tinción de ambas líneas celulares (figura 21). Como con la línea celular A431, mAb806 claramente tiñó ambas líneas celulares pero a un nivel menor que la observada con el anticuerpo 528 (Figura 21). Por lo tanto, la unión de mAb806 no está simplemente restringido a células A431 pero parece ser una observación general para las células que contienen la amplificación del gen EGFR.

[0304] El reconocimiento de sEGFR de tipo salvaje por mAb806 requiere claramente cierta desnaturalización del receptor con el fin de exponer el epítipo. El grado de desnaturalización requerido es sólo ligero ya que incluso la absorción de sEGFR de tipo salvaje sobre una superficie de plástico indujo la unión robusta de mAb806 en ensayos ELISA. Como mAb806 sólo se unía aproximadamente al 10% de la EGFR en la superficie de las células A431, es tentador especular que este subconjunto de receptores puede tener una conformación alterada similar a la inducida por el truncamiento EGFR de2-7. De hecho, la expresión extremadamente alta del EGFR mediada por la amplificación génica en células A431 puede causar que algunos receptores se procesen incorrectamente lo que conduce a una conformación alterada. Curiosamente, la inmunotransferencia semi-cuantitativa de lisados de células A431 con mAb806 demostró que podía reconocer la mayoría de los receptores de EGF de A431 después de SDS-PAGE y transferencia western. Este resultado apoya el argumento de que mAb806 se une a un subconjunto de receptores en la superficie de las células A431 que tienen una conformación alterada. Estas observaciones en células A431 son consistentes con los datos de inmunohistoquímica que muestran que mAb806 se une a gliomas que contienen la amplificación del gen EGFR. Como la unión de mAb806 fue completamente negativa en las células U87MG parentales, parecería que este fenómeno puede estar restringido a células que contienen EGFR amplificado aunque el nivel de receptor "desnaturalizado" en la superficie de las células U87MG puede estar por debajo del nivel de detección. Sin embargo, esto parece poco probable, ya que mAb806 yodado no se unió a los sedimentos celulares de U87MG que contienen hasta 1×10^7 células.

Ejemplo 9Reconocimiento in vivo de células A431 por mAb806

5 **[0305]** Se realizó un segundo estudio de biodistribución con mAb806 para determinar si podía reconocer xenoinjertos tumorales A431. El estudio se realizó durante un transcurso de tiempo más largo con el fin de obtener más información sobre el reconocimiento de xenoinjertos U87MG.Δ2-7 por mAb806, que fueron incluidos en todos los ratones como control positivo. Además, el anticuerpo anti-EGFR se incluyó como control positivo para los xenoinjertos A431, puesto que un estudio anterior mostró un reconocimiento bajo pero significativo de este anticuerpo a células A431 crecidas en ratones desnudos (Masui et al. (Inhibición 1984) Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. Cancer Res. 44, 1002-7).

10 **[0306]** Durante las primeras 48 h, mAb806 mostró propiedades de reconocimiento casi idénticas a las observadas en los experimentos iniciales (Figura 7A en comparación con la Figura 4A). En términos de % ID/g de tumor, los niveles de mAb806 en xenoinjertos de U87MG.Δ2-7 disminuyeron lentamente después de 24 h pero siempre se mantuvieron más altos que los niveles detectados en tejido normal. La absorción en los xenoinjertos de A431 fue comparativamente baja, sin embargo, había un pequeño incremento en %ID/g de tumor durante las primeras 24 h no observadas en los tejidos normales, tales como hígado, bazo, riñón y pulmón (Figura 7A). La absorción del anticuerpo 528 fue muy baja en ambos xenoinjertos cuando se expresa como %ID/g de tumor (figura 7b) parcialmente debido a la depuración más rápida de este anticuerpo de la sangre. La autorradiografía de secciones de tejido de xenoinjerto A431 recogidas 24 h después de la inyección con solo mAb806 marcado con ¹²⁵I ilustra claramente la localización del anticuerpo al tumor viable alrededor de la periferia del tumor y no en las áreas centrales de necrosis (Figura 23). En cuanto a la relación del tumor a la sangre mAb806 alcanzó un máximo a las 72 h para xenoinjertos U87MG.Δ2-7 y 100 h para xenoinjertos A431 (Figuras 8A, B). Aunque la relación de tumor a sangre para mAb806 nunca superó 1,0 con respecto al tumor A431, se incrementó a lo largo de todo el transcurso del tiempo (Figura 8B) y fue mayor que todos los otros tejidos examinados (datos no mostrados) que indicaban bajos niveles de reconocimiento.

20 **[0307]** La relación de tumor a sangre para el anticuerpo 528 mostró un perfil similar a mAb806 aunque se observaron niveles más altos en los xenoinjertos A431 (Figuras 8A, B). mAb806 tenía una relación tumor a hígado máxima en xenoinjertos U87MG.Δ2-7 de 7,6 a las 72 h, lo que demuestra claramente la absorción preferente en estos tumores en comparación con el tejido normal (figura 8C). Otras relaciones de tumor a órgano para mAb806 fueron similares a las observadas en el hígado (datos no mostrados). El máximo de la relación de tumor a hígado para mAb806 en xenoinjertos A431 fue de 2,0 a las 100 h, indicando de nuevo una absorción ligeramente preferente en el tumor en comparación con el tejido normal (figura 8D).

Ejemplo 10Estudios de terapia

40 **[0308]** Los efectos de mAb806 fueron evaluados en dos modelos de xenoinjertos de modelo preventivo de enfermedad y un modelo de tumor establecido.

Modelos de xenoinjerto

45 **[0309]** De acuerdo con informes anteriores (Nishikawa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91 (16), 7.727-7.731), las células U87MG transfectadas con EGFR de2-7 creció más rápidamente que las células parentales y las células U87MG transfectadas con el wtEGFR. Por lo tanto, no fue posible crecer ambos tipos de células en los mismos ratones.

50 **[0310]** Se inocularon subcutáneamente células tumorales (3×10^6) en 100 ml de PBS en ambos flancos de ratones desnudos hembra 4-6 semanas de edad (Centro de Investigación Animal, Australia Occidental, Australia). La eficacia terapéutica de mAb806 se investigó en modelos tumorales preventivos y establecidos. En el modelo preventivo, 5 ratones con dos xenoinjertos cada uno fueron tratados intraperitonealmente con 1 o 0,1 mg de mAb806 o vehículo (PBS) empezando el día antes de la inoculación de células tumorales. Se continuó el tratamiento durante un total de 6 dosis, 3 veces por semana durante 2 semanas. En el modelo establecido, el tratamiento se inició cuando los tumores habían alcanzado un volumen promedio de $65 \pm 6,42 \text{ mm}^3$ (U87MG.Δ2-7), $84 \pm 9,07 \text{ mm}^3$ (U87MG), $73 \pm 7,5 \text{ mm}^3$ (U87MG.wtEGFR) o $201 \pm 19,09 \text{ mm}^3$ (tumores A431). El volumen del tumor en mm^3 se determinó utilizando la fórmula $(\text{longitud} \times \text{ancho}^2)/2$, donde la longitud era el eje más largo y ancho la medida en ángulo recto a la longitud (Clark et al. (2000) Therapeutic efficacy of anti-Lewis (y) humanized 3S 193 radioimmunotherapy in a breast cancer model: enhanced activity when combined with taxol chemotherapy. Clin Cancer Res 6, 3621-3628). Los datos se expresaron como el volumen promedio del tumor \pm SE para cada grupo de tratamiento. El análisis estadístico se llevó a cabo en los puntos de tiempo determinados utilizando la prueba t de Student. Los animales fueron sacrificados cuando los xenoinjertos alcanzaron un volumen aproximado de $1,5 \text{ cm}^3$ y

los tumores se extirparon para su examen histológico. Este proyecto de investigación fue aprobado por el Comité de Ética Animal del Centro Médico Austin y de repatriación.

Examen histológico de xenoinjertos de tumores

[0311] Se extirparon y diseccionaron los xenoinjertos. Una mitad se fijó en formalina al 10%/PBS antes de ser embebida en parafina. A continuación se cortaron secciones de cuatro micras y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H & E) para el examen histológico de rutina. La otra mitad se embebicó en compuesto Tissue Tek® OCT (Sakura Finetek, Torrance, CA), se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a 80°C. Se cortaron secciones de criostato delgadas (5 micras) y se fijaron en acetona enfriada con hielo durante 10 min seguido por secado al aire durante otros 10 min. Las secciones se bloquearon en reactivo de bloqueo de proteína (Lipshaw Immunon, Pittsburgh EE.UU.) durante 10 min y después se incubaron con anticuerpo primario biotinilado (1 mg/ml), durante 30 min a temperatura ambiente (RT). Todos los anticuerpos se biotinilaron utilizando el módulo de biotinilación de proteína ECL (Amersham, Baulkham Hills, Australia), según las instrucciones del fabricante. Después de enjuagar con PBS, las secciones se incubaron con un complejo de peroxidasa de rábano picante y estreptavidina durante 30 min (Silenus, Melbourne, Australia). Después de un lavado final con PBS, las secciones se expusieron a sustrato 3-amino-9-etilcarbozol (AEC) (ácido acético 0,1 M, acetato de sodio 0,1 M, AEC 0,02 M (Sigma Chemical Co., St Louis, MO)) en presencia de peróxido de hidrógeno durante 30 min. Las secciones se lavaron con agua y se contratiñeron con hematoxilina durante 5 min y se montaron.

Eficacia de mAb806 en el Modelo Preventivo

[0312] Se examinó mAb806 para la eficacia contra tumores U87MG y U87MG.Δ2-7 en un modelo de xenoinjerto preventivo. Se administraron i.p. anticuerpo o vehículo el día antes de la inoculación del tumor y se le administró 3 veces por semana durante 2 semanas. mAb806 no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de xenoinjertos U87MG parentales, que expresan el wtEGFR, a una dosis de 1 mg por inyección (Figura 9a). En cambio, mAb806 inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos U87MG.Δ2-7 de una manera dependiente de la dosis (Figura 9b). En el día 20, cuando se sacrificaron los animales de control, el volumen promedio del tumor era de $1637 \pm 178,98 \text{ mm}^3$ para el grupo de control, estadísticamente menor $526 \pm 94,74 \text{ mm}^3$ para 0,1 mg por grupo de inyección ($p < 0,000$) y $197 \pm 42,06 \text{ mm}^3$ para el grupo de inyección 1 mg ($p < 0,0001$). Los grupos de tratamiento fueron sacrificados en el día 24, en cuyo momento los volúmenes promedio de tumor eran $1287 \pm 243,03 \text{ mm}^3$ para el grupo tratado con 0,1 mg y $492 \pm 100,8 \text{ mm}^3$ para el grupo de 1 mg.

Eficacia de mAb806 en modelo de xenoinjerto establecido

[0313] Dada la eficacia de mAb806 en el modelo de xenoinjerto preventivo, se examinó entonces su capacidad para inhibir el crecimiento de xenoinjertos de tumores establecidos. El tratamiento con anticuerpo fue como se describe en el modelo preventivo excepto que comenzó cuando los tumores habían alcanzado un volumen promedio del tumor de $65 \pm 6,42 \text{ mm}^3$ para los xenoinjertos U87MG.Δ2-7 y $84 \pm 9,07 \text{ mm}^3$ para los xenoinjertos U87MG parentales. Una vez más, mAb806 no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de xenoinjertos U87MG parentales a una dosis de 1 mg por inyección (Figura 10A). En cambio, mAb806 inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos U87MG.Δ2-7 de una manera dependiente de la dosis (figura 10B). En el día 17, un día antes de sacrificar los animales de control, el volumen tumoral promedio fue de $935 \pm 215,04 \text{ mm}^3$ para el grupo de control, $386 \pm 57,51 \text{ mm}^3$ para el grupo de 0,1 mg por inyección ($p < 0,01$) y $217 \pm 58,17 \text{ mm}^3$ para el grupo de inyección de 1 mg ($p < 0,002$).

[0314] Para examinar si la inhibición del crecimiento observada con mAb806 se restringió a la célula que expresa EGFR de2-7, se examinó su eficacia contra xenoinjertos tumorales U87MG.wtEGFR en un modelo establecido. Estas células sirven como modelo para tumores que contienen la amplificación del gen EGFR sin la expresión de EGFR de2-7. El tratamiento con mAb806 comenzó cuando los tumores habían alcanzado un volumen tumoral promedio de $73 \pm 7,5 \text{ mm}^3$. mAb806 inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos U87MG.wtEGFR establecidos cuando se comparó con los tumores de control tratados con vehículo (Figura 10C). En el día en que los animales de control fueron sacrificados, el volumen tumoral promedio fue de $960 \pm 268,9 \text{ mm}^3$ para el grupo control y $468 \pm 78,38 \text{ mm}^3$ para el grupo tratado con inyecciones de 1 mg ($p < 0,04$).

Análisis histológico e inmunohistoquímico de tumores establecidos

[0315] Para evaluar posibles diferencias histológicas entre xenoinjertos U87MG.Δ2-7 y U87MG.wtEGFR tratados con mAb806 y de control (recogidos en los días 24 y 42 respectivamente), las secciones fijadas en formalina y embebidas en parafina se tiñeron con H & E. Las áreas de necrosis se observaron en las secciones tanto de xenoinjertos U87MG.Δ2-7 (recogidos 3 días después de completar el tratamiento), como de xenoinjertos U87MG.wtEGFR (recogidos 9 días después del completar el tratamiento) tratados con mAb806. Este resultado se observó consistentemente en una serie de xenoinjertos de tumores ($n = 4$). Sin embargo, el análisis de las secciones de xenoinjertos tratados con el control no mostró las mismas áreas de necrosis observada con el tratamiento con mAb806. Las secciones de xenoinjertos U87MG tratados con mAb806 o control también se tiñeron con H & E y no

revelaron diferencias en la viabilidad celular entre los dos grupos, apoyando además la hipótesis de que la unión a mAb806 disminuía la viabilidad celular/necrosis en xenoinjertos tumorales.

[0316] Se realizó un análisis inmunohistoquímico de secciones de xenoinjertos U87MG, U87MG.Δ2-7 y U87MG.wtEGFR para determinar los niveles de expresión de 2-7 y wtEGFR después del tratamiento con mAb806. Las secciones se recogieron en los días 24 y 42 como antes, y se inmunotñieron con los anticuerpos 528 o 806. Como era de esperar, el anticuerpo 528 teñía todas las secciones de xenoinjertos sin disminución obvia en intensidad entre los tumores tratados y de control. La tinción de secciones de U87MG era indetectable con mAb806, sin embargo se observó tinción positiva de las secciones de los xenoinjertos U87MG.Δ2-7 y U87MG.wtEGFR. No hubo diferencias en la densidad de tinción de mAb806 entre los xenoinjertos U87MG.Δ2-7 y U87MG.wtEGFR tratados y de control, lo que sugiere que el tratamiento con anticuerpo no regula hacia abajo la expresión de 2-7 o wtEGFR.

Tratamiento de xenoinjertos A431 con mAb806

[0317] Para demostrar que los efectos anti-tumorales de mAb806 no estaban restringidos a las células U87MG, el anticuerpo se administró a ratones con xenoinjertos A431. Estas células contienen un gen de EGFR amplificado y expresan aproximadamente 2×10^6 receptores por célula. Tal como se describió anteriormente, mAb806 se une aproximadamente al 10% de estos EGFR y reconoce xenoinjertos A431. mAb806 inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos A431 cuando se examinó en el modelo de xenoinjerto preventivo descrito previamente (figura 11A). En el día 13, cuando se sacrificaron los animales de control, el volumen tumoral promedio fue de $1385 \pm 147,54 \text{ mm}^3$ en el grupo control y $260 \pm 60,33 \text{ mm}^3$ para el grupo de tratamiento de inyección de 1 mg ($p < 0,0001$).

[0318] En un experimento separado, una dosis de 0,1 mg de mAb también inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos A431 en un modelo preventivo.

[0319] Dada la eficacia de mAb806 en el modelo preventivo de xenoinjerto A431, se examinó su capacidad para inhibir el crecimiento de xenoinjertos de tumores establecidos. El tratamiento con anticuerpo fue como el descrito en el modelo preventivo excepto que no se inició hasta que los tumores habían alcanzado un volumen tumoral promedio de $201 \pm 19,09 \text{ mm}^3$. mAb806 inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos de tumores establecidos (figura 11B). En el día 13, cuando se sacrificaron los animales de control, el volumen tumoral promedio fue de $1,142 \pm 120,06 \text{ mm}^3$ para el grupo control y $451 \pm 65,58 \text{ mm}^3$ para el grupo de inyección de 1 mg ($p < 0,0001$).

[0320] En resumen, los estudios de terapia con mAb806 aquí descritos claramente demostraron la inhibición dependiente de la dosis del crecimiento de xenoinjertos U87MG.Δ2-7. En cambio, no se observó inhibición de los xenoinjertos U87MG parentales a pesar del hecho de que continúan expresando el wtEGFR in vivo. mAb806 no sólo redujo significativamente el volumen del xenoinjerto, también indujo una necrosis significativa en el tumor. Este es el primer informe que muestra el uso terapéutico exitoso de dicho anticuerpo in vivo contra xenoinjertos de glioma que expresan EGFR de 2-7 humanos.

[0321] La amplificación génica del EGFR se ha descrito en un número de diferentes tumores y se observa en aproximadamente el 50% de los gliomas (Voldberg et al., 1997). Se ha propuesto que la posterior sobreexpresión de EGFR mediada por la amplificación del gen del receptor puede conferir una ventaja de crecimiento mediante el aumento de la señalización intracelular y el crecimiento celular (Filmus et al., 1987). La línea celular U87MG se transfeció con el wtEGFR con el fin de producir una célula de glioma que imita el proceso de amplificación del gen de EGFR. El tratamiento de xenoinjertos U87MG.wtEGFR establecidos con mAb806 dio lugar a la inhibición de un crecimiento significativo. Por lo tanto, mAb806 también media la actividad antitumoral in vivo contra células que contienen la amplificación del gen de EGFR. Curiosamente, la inhibición por mAb806 de xenoinjertos U87MG.wtEGFR parece ser menos eficaz que la observada con los tumores U87MG.Δ2-7. Esto probablemente refleja el hecho de que mAb806 tiene una menor afinidad por el EGFR amplificado y sólo se une a una pequeña proporción de receptores expresados en la superficie celular. Sin embargo, cabe señalar que a pesar del pequeño efecto sobre los volúmenes de xenoinjertos U87MG.wtEGFR, el tratamiento con mAb806 produjo grandes zonas de necrosis en estos xenoinjertos.

[0322] Para descartar la posibilidad de que mAb806 solamente media la inhibición de las líneas celulares derivadas de U87MG se probó su eficacia contra xenoinjertos A431. Esta línea celular derivada de carcinoma de células escamosas contiene la amplificación del gen de EGFR significativa que se mantiene tanto in vitro como in vivo. El tratamiento de xenoinjertos de A431 con mAb806 produjo la inhibición significativa del crecimiento tanto en un modelo preventivo como un modelo establecido, lo que indica que los efectos anti-tumorales de mAb806 no se limitan a líneas celulares U87MG transfectadas.

Ejemplo 11

Tratamiento de terapia de combinación de xenoinjertos A431 con mAb806 y AG1478

[0323] Los efectos antitumorales de mAb806 combinados con AG 1478 se probaron en ratones con xenoinjertos A431. AG1478 (4-(3-Cloroanilino)-6,7-dimetoxiquinazolina) es un inhibidor potente y selectivo de la quinasa de EGFR en comparación con HER2-neu y la quinasa del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (Calbiochem Cat. No. 658552). Se incluyeron tres controles: tratamiento con sólo el vehículo, vehículo + mAb806 solamente, y vehículo + AG1478 solamente. Los resultados se ilustran en la figura 12. Se administraron 0,1 mg de mAb806 1 día antes de xenoinjerto y 1, 3, 6, 8 y 10 días después de xenoinjerto. Se administraron 400 µg de AG1478 0, 2, 4, 7, 9, y 11 días después de xenoinjerto.

[0324] Tanto AG1478 como mAb806, cuando se administraron solos, produjeron una reducción significativa del volumen del tumor. Sin embargo, en combinación, la reducción del volumen del tumor se mejoró en gran medida.

[0325] Además, la unión de mAb806 a EGFR de las células A431 se evaluó en ausencia y presencia de AG 1478. Las células se colocaron en medio libre de suero durante la noche, después se trataron con AG 1478 durante 10 minutos a 37°C, se lavaron dos veces en PBS, a continuación se lisaron en Triton al 1% y los lisados se prepararon por centrifugación durante 10 min a 12.000 g. A continuación, el lisado se evaluó por la reactividad de 806 mediante un ELISA en una versión modificada de un ensayo descrito por Schooler y Wiley, Analytical Biochemistry 277, 135-142 (2000). Las placas se recubrieron con 10 µg/ml de mAb806 en PBS/EDTA durante la noche a temperatura ambiente y después se lavaron dos veces. Las placas se bloquearon a continuación con albúmina de suero al 10%/PBS durante 2 horas a 37°C y se lavaron dos veces. Se añadió un lisado celular 1:20 en albúmina de suero al 10%/PBS durante 1 hora a 37°C, a continuación se lavó cuatro veces. Se hizo reaccionar anti-EGFR (SC-03; Santa Cruz Biotechnology Inc.) en albúmina de suero al 10%/PBS 90 min a temperatura ambiente, la placa se lavó cuatro veces, y se añadió anti-conejo-HRP (1:2000 si de Silenus) en albúmina de suero al 10%/PBS durante 90 min a temperatura ambiente, se lavó cuatro veces, y el color se reveló utilizando ABTS como sustrato. Se encontró que la unión de mAb806 se incrementa significativamente en presencia de cantidades crecientes de AG1478 (figura 13).

Ejemplo 12

Inmunorreactividad en glioblastomas humanos pre-tipado para el estado de EGFR

[0326] Dada la alta incidencia de la expresión, amplificación y mutación de EGFR en glioblastomas, se realizó un estudio inmunohistoquímico detallado con el fin de evaluar la especificidad de 806 en los tumores diferentes de los xenoinjertos. Se analizó un panel de 16 glioblastomas mediante inmunohistoquímica. Este panel de 16 glioblastomas se pretipó por RT-PCR para la presencia de EGFR de tipo salvaje amplificado y la expresión de EGFR de2-7. Seis de estos tumores expresaron solamente la transcripción de wtEGFR, 10 tenían la amplificación del gen de wtEGFR con 5 de éstos mostrando solo transcripciones de EGFR de tipo salvaje, y 5 transcritos del gen de EGFR de tipo salvaje y de2-7.

[0327] Se realizó el análisis inmunohistoquímico utilizando secciones de 5 mm de tejido fresco congelado aplicado a cortes histológicos y se fijó durante 10 minutos en acetona fría. Se detectó anticuerpo primario unido con anticuerpo de caballo anti-ratón biotinilado seguido por una reacción del complejo avidina-biotina. Se utilizó tetraclorhidrato de diaminobencidina (DAB) como cromógeno. El grado de reactividad inmunohistoquímica en tejidos se estimó por microscopía de luz y se clasificó de acuerdo con el número de células inmunorreactivas en incrementos del 25% de la siguiente manera:

Focal = menos de 5%

+ = 5-25%

++ = 25-50%

+++ = 50-75%

++++ => 75%

[0328] El anticuerpo 528 mostró una intensa reactividad en todos los tumores, mientras que la inmunotinción de DH8.3 se restringió a aquellos tumores que expresan el EGFR de2-7 (Tabla 2). En consonancia con las observaciones anteriores en FACS y ensayos de formación en rosetas, mAb806 no reaccionó con los glioblastomas que expresan el transcrito de wtEGFR a partir de genes de EGFR no amplificado (Tabla 2). Este patrón de reactividad para mAb806 es similar al observado en los estudios de xenoinjertos y de nuevo sugiere que este anticuerpo reconoce el EGFR de2-7 y amplificado pero no el wtEGFR cuando se expresa en la superficie celular.

Tabla 2

Inmunoreactividad de mAbs528, DH8.3 y 806 en glioblastomas pretipados por la presencia de EGFR de tipo salvaje y EGFR de2-7 mutado y por su estado de amplificación				
Amplificación	Expresión de EGFRde2-7	528	DH8.3	806
	No	++++	-	-
	No	++++	-	-*
	No	++++	-	-
	No	++	-	-

	No	+++	-	-
Sí	No	++++	-	-
Sí	No	++++	-	++++
Sí	No	++++	-	+
Sí	No	++++	-	+++
Sí	No	++++	-	++++
Sí	No	++++	-	+++++
Sí	Sí	++++	++++	++++
Sí	Sí	++++	++++	++++
Sí	Sí	++++	++++	++++
Sí	Sí	++++	++	++
*tinción focal				

Ejemplo 13

Inmunoreactividad de EGFR en tejido normal

5 [0329] Con el fin de determinar si el EGFR de2-7 se expresa en tejido normal, se llevó a cabo un estudio
 10 inmunohistoquímico con mAb806 y DH8.3 en un panel de 25 tejidos. No hubo una fuerte inmunoreactividad con
 cualquiera de mAb806 o DH8.3 en cualquier tejido probado, lo que sugiere que el EGFR de2-7 está ausente en
 tejidos normales (Tabla 3). Hubo algo de tinción variable presente en las amígdalas con mAb806 que se limitó a la
 15 capa de células basales de la epidermis y las células escamosas de la mucosa del epitelio. En placenta, se observó
 una inmunotinción ocasional del epitelio trofoblasto. Curiosamente, dos tejidos que expresan altos niveles
 endógenos de wtEGFR, el hígado y la piel, no mostraron ninguna reactividad significativa de mAb806. No se
 observó reactividad con las muestras de hígado en absoluto, y se detectó una reactividad focal sólo débil e
 inconsistente ocasionalmente (en no más de 10% de todas las muestras estudiadas) en los queratinocitos basales
 en muestras de piel y en el epitelio escamoso de la mucosa de las amígdalas, demostrando además que este
 anticuerpo no se une al wtEGFR expresado en la superficie de células en un grado significativo (Tabla 3). Todos los
 tejidos fueron positivos para el wtEGFR como lo demuestra la tinción universal observada con el anticuerpo 528
 (Tabla 3).

20

Tabla 3

Reactividad de 582, DH8.3 y 806 en tejidos normales			
Tejido	528	DH8.3	806
Esófago	pos	-	-
Estómago	pos	-	-
Duodeno	pos	-	-
Intestino delgado/Duodeno	Pos	-	-
Colon	Pos	-	-
Hígado	Pos	-	-
Glándulas salivares (parótida)	pos	-	-
Riñón	Pos	-	-
Vejiga urinaria	Pos	-	-
Próstata	Pos	-	-
Testículos	Pos	-	-
Útero (cx/endom)	Pos	-*	-
Trompa de Falopio	Pos	-	-
Ovario	Pos	-	-
Mama	Pos	-*	-
Placenta	Pos	-	-
Nervio periférico	Pos	-	-
Músculo esquelético	Pos	-	-
Glándula tiroides	Pos	-	-
Nódulo linfático	Pos	-	-
Bazo	Pos	-	-
Amígdalas	Pos	-	-reactividad ocasional débil de la capa basal de epitelio escamoso
Corazón	Pos	-	-
Pulmón	Pos	-	-

Piel	Pos	-	-reactividad ocasional débil de la capa basal de epitelio escamoso
*cierto tinción estromal en varios tejidos			

Ejemplo 14

Inmunoreactividad de EGFR en varios tumores

5

[0330] Se examinó el grado de EGFR de2-7 en otros tipos de tumores usando un panel de 12 tumores malignos diferentes. El anticuerpo 528 mostró tinción homogénea frecuente en muchos tumores analizados, excepto el melanoma y el seminoma. Cuando está presente, la inmunoreactividad de DH8.3 se limitó a la célula tumoral focal ocasional, lo que indica que hay poca o ninguna expresión de EGFR de2-7 en los tumores fuera del cerebro utilizando este sistema de detección (Tabla 4). También hubo tinción focal de los vasos sanguíneos y una tinción difusa variable de tejido conectivo con el anticuerpo DH8.3 en algunos tumores (Tabla 4). Esta tinción fue fuertemente dependiente de la concentración de anticuerpo utilizada y se consideró una reactividad de base no específica. El mAb806 mostró tinción positiva en el 64% de los tumores de cabeza y cuello y el 50% de los carcinomas de pulmón (Tabla 4). Hubo poca reactividad de mAb806 en otra parte excepto en los tumores urinarios que fueron positivos en el 30% de los casos.

10

15

[0331] Dado que los cánceres de cabeza y cuello y pulmón fueron negativos para el anticuerpo DH8.3 la reactividad observada con el mAb en estos tumores puede estar asociada con la amplificación del gen de EGFR.

20

Tabla 4

Anticuerpos monoclonales 528, DH8.3 y 806 en panel de tumores			
Tumor	528	DH8.3	806
Metástasis de melanoma maligno	0/10	0/10	0/10
Vejiga urinaria (tcc, sqcc, adeno)	10/10 (7x++++, 2x++++, 1x+)	1/10 (1x+)	3/10* (2x++++, 1x++)
Glándula mamaria	6/10 (3x++++, 3x++)	0/11*	1/10 /foc)
Cáncer de cabeza y cuello (sqcc)	11/11 (1x++++-10x++++)	0/12*	7/11 /3x++++, 3x+++ , 1x+)
Pulmón (sqcc, adeno, neuroend)	12/12 (10x++++-1x+++)	0/5	6/12 (3x++++ 3x+++)
Leiomiomasarcoma	5/5 (2x+3x+++)	0/5	0/5
Liposarcoma	5/5 (2x+3x+++)	0/5	0/5*
Sarcoma sinovial	4/5* (4x +++)	0/5	0/5*
Histiocitoma fibroso maligno Mfh	4/5*	0/5*	0/5*
Carcinoma de colon	10/10 (9x++++, 1x+)	0/10*	0/10
Seminoma	1/10*	1/10*	0/10
Ovario (seroso-papilar)	4/5 (3x++++, 1x+)	0/5*	0/5
*tinción focal			

Ejemplo 15

Inmunoreactividad en glioblastomas humanos no seleccionados para el estado de EGFR

25

[0332] Con el fin de confirmar la especificidad única y para evaluar la reactividad de mAb806, se comparó con los anticuerpos 528 y DH8.3 en un panel de 46 glioblastomas no preseleccionados por su estado de EGFR. El anticuerpo 528 era fuerte y homogéneamente positivo en todas las muestras, excepto dos (Nos. 27 y 29) (44/46, 95,7%). Estos dos casos también fueron negativos para mAb806 y mAbDH8.3. El mAb806 fue positivo en 27/46 (58,7%) casos, 22 de los cuales mostraron una inmunoreactividad homogénea en más del 50% del tumor. El anticuerpo DH8.3 fue positivo en 15/46 (32,6%) glioblastomas, 9 de los cuales mostraron una inmunoreactividad homogénea. La tinción inmunológica de estos tumores no seleccionados se tabulan en la Tabla 5.

30

35

[0333] Hubo concordancia entre mAb806 y DH8.3 en todos los casos excepto uno (N° 35). Un análisis molecular para detectar la presencia de la amplificación de EGFR se realizó en 44 casos (Tabla 5). De éstos, 30 casos cotiparon con el patrón de inmunoreactividad de mAb806 previamente establecido: por ejemplo, 16 casos negativos de mAb806 revelaron la no amplificación del EGFR y 14 casos de EGFR amplificado también fueron inmunopositivos de mAb806. Sin embargo, 13 de los casos, que mostraron inmunoreactividad con 806, fueron negativos para la amplificación del EGFR, mientras que un caso amplificado de EGFR fue mAb806 negativo. Un análisis más detallado de la situación de la mutación de estos casos de amplificación negativo y positivos de 806 se describe a

40

continuación y proporciona una explicación para la mayoría de los 13 casos que fueron negativos para la amplificación de EGFR y fueron reconocidos por 806.

5 [0334] Posteriormente, se realizó un análisis molecular de la mutación por delección mediante RT-PCR en 41/46 casos (Tabla 5). De éstos, 34 casos cotiparon con DH8.3 específico para la mutación por delección: 12 casos fueron positivos en RT-PCR e inmunohistoquímica y 22 casos fueron negativo/negativo. Tres casos (# 2, # 34 y # 40) fueron DH8.3 positivo/RT-PCR negativo para la mutación por delección y tres casos (# 12, # 18 y # 39) fueron DH8.3 negativo/RT-PCR positivo. Como era de esperar en base de nuestro análisis de la especificidad anterior, se observó la inmunoreactividad de mAb806 en todos los tejidos DH8.3 positivos, salvo en un caso (# 35).

10 [0335] Caso # 3 también reveló una mutación (designada A2 en la Tabla 5), que incluía las secuencias de la mutación de2-7 pero esto no parecía ser la delección de2-7 clásica con la pérdida de las 801 bases (datos no mostrados). Este caso fue negativo para la reactividad de DH8.3, pero mostró reactividad con 806, lo que indica que 806 puede reconocer una mutación de EGFR adicional y posiblemente única.

15 Tabla 5

Análisis inmunohistoquímico de 46 glioblastomas no seleccionados con mAb 528, 806 y DH8.3					
#	528	806	DH8.3	EGFR Amp.*	5'MUT
1	++++	++++	++	A	5'MUT
2	++++	++++	++++	N	WT
3	++++	++++ (det.)	Neg.	N	A2
4	++++	++++	Neg.	N	WT
5	++++	++++	++++	N	5'MUT
6	++++	++++	Neg.	A	WT
7	++++	++++	++++	N	5'MUT
8	++++	++++	++++	A	5'MUT
9	++++	++++	Neg.	A	WT
10	++++	Neg-	Neg.	N	WT
11	++	++	++	A	5'MUT
12	++++	++	Neg.	A	5'MUT
13	++++	++++	Neg.	N	WT
14	++	Neg.	Neg.	Nd	nd
15	++	++	Neg.	N	WT
16	+	Neg.	Neg.	N	nd
17	++++	Neg.	Neg.	N	WT
18	++++	++++	Neg.	A	5'MUT
19	++++	++++	Neg.	N	WT
20	++++	Neg.	Neg.	N	WT
21	++++	++++	Neg.	N	WT
22	+++	Neg.	Neg.	N	WT
23	++++	++++	++	N	5'MUT
24	++++	++++	Neg.	A	WT
25	++++	Neg.	Neg.	N	WT
26	++++	++++	+++	A	5'MUT
27	Neg.	Neg.	Neg.	N	WT
28	+++	Neg.	Neg.	N	WT
29	Neg.	Neg.	Neg.	N	WT
30	++++	++++	Neg.	N	WT
31	++++ par det	Neg.	Neg.	N	nd
32	++	+++	++	N	5'MUT
33	+++	++++	++++	A	5'MUT
34	++++	+++	++++	N	WT
35	++++	Neg.	++++	A	5'MUT
36	+++	++	+++	A	5'MUT
37	++++	+	+	A	5'MUT
38	++++	Neg.	Neg.	N	WT
39	++	Neg.	Neg.	N	5'MUT
40	++++	++++	+	A	WT
41	++	Neg.	Neg.	N	WT
42	++++	++++	Neg.	A	WT
43	++++	Neg.	Neg.	nd	nd
44	++++	Neg.	Neg.	N	WT
45	++++	Neg.	Neg.	N	WT

46	++++	Neg.	Neg.	N	Nd
*N = no amplificado, A amplificado +WT = tipo salvaje, 5'-mut nd = no realizado					

[0336] La reactividad del anticuerpo 806 se cotipó con EGFR amplificado o mutante de2-7 en 19/27 o más del 70% de los casos. Es destacable que 2 de estos 8 casos también fueron reactivos con DH8.3.

5 Ejemplo 16

Tratamiento sistémico y análisis de tumores de glioma intracraneales

10 [0337] Para probar la eficacia del anticuerpo monoclonal anti-ΔEGFR, mAb806, se trataron ratones desnudos portadores de xenoinjertos de glioma que sobreexpresan ΔEGFR intracraneal con inyecciones intraperitoneales de mAb806, el control de isotipo IgG o PBS.

15 [0338] Dado que los explantes primarios de glioblastomas humanos pierden rápidamente la expresión de receptores amplificados, redistribuidos en el cultivo, no existen líneas celulares de glioblastoma existentes que muestren dicha expresión. Para forzar el mantenimiento de los niveles de expresión comparables a los observados en los tumores humanos, U87MG, LN-Z308 y A1207 (obsequio del doctor S. Aaronson, Mount Sinai Medical Center, Nueva York, NY), las células fueron infectadas con virus de ΔEGFR, ΔEGFR deficiente en quinasa (DK), o EGFR de tipo salvaje wtEGFR), que también confieren resistencia a G418 como se ha descrito previamente (Nishikawa et al. (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91, 7727-7731).

20 [0339] Se seleccionaron poblaciones que expresan niveles similares de los diversos alelos de EGFR (estos niveles de expresión corresponden aproximadamente a un nivel de amplificación de 25 copias de genes; los glioblastomas humanos tienen típicamente niveles de amplificación de 10 a 50 copias de genes del receptor truncado) por FACS como se describe previamente (Nishikawa et al., 1994) y designaron como U87MG.ΔEGFR, U87MG.DK, U87MG.wtEGFR, LN-Z308.ΔEGFR, LN-Z308.DK, LN-Z308.wtEGFR, A1207.ΔEGFR, A1207.DK, y A1207.wtEGFR, respectivamente. Cada una se mantuvo en medio que contenía G418 (líneas celulares U87MG, 400 μg/ml; líneas celulares LN-Z308 y A1207, 800 μg/ml).

30 [0340] Las células U87MG.ΔEGFR (1 X 10⁵) o 5 X 10⁵ células LN-Z308.Δ EGFR, A1207.Δ EGFR, U87MG, U87MG.DK, y U87MG.wtEGFR en 5 μl de PBS se implantaron en el estrato corpus derecho de los cerebros de ratones desnudos como se describió previamente (Mishima et al. (2000) A peptide derived from the non-receptor binding región of urokinase plasminogen activator inhibits glioblastoma growth and angiogenesis in vivo in combination with cisplatin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 8484-8489). La terapia sistémica con mAb806, o el control de isotipo IgG2b, se llevó a cabo mediante inyección i.p. de 1 ug de mAb en un volumen de 100 ul cada dos días desde el primer día después de la implantación 0 a 14. Para la terapia directa de tumores U87MG.ΔEGFR intracerebrales, se inyectaron 10 ug de mAb806, o el control de isotipo IgG2b, en un volumen de 5 ul en el sitio de inyección del tumor cada dos días comenzando en el día 1 durante 5 días.

40 [0341] Los animales tratados con PBS o IgG control de isotipo tuvieron una supervivencia media de 13 días, mientras que los ratones tratados con mAb806 tuvieron un incremento del 61,5% en la supervivencia media hasta 21 días (P <0,001; figura 24A).

45 [0342] El tratamiento de ratones 3 días después de la implantación, después del establecimiento del tumor, también extendió la supervivencia media de los animales tratados con mAb806 en un 46,1% (de 13 días a 19 días; P <0,01) en comparación con la de los grupos de control (datos no mostrados).

50 [0343] Para determinar si estos efectos antitumorales de mAb806 extendidos más allá de los xenoinjertos U87MG.ΔEGFR, se administraron tratamientos similares a los animales que llevaban otros xenoinjertos celulares de glioma de LN-Z308.ΔEGFR y A1207.EGFR. La supervivencia media de los ratones tratados con mAb806 que llevaban xenoinjertos LN-Z308.EGFR se amplió de 19 días para los controles a 58 días (P <0,001; figura 24B). Cabe destacar que cuatro de los ocho animales tratados con mAb806 sobrevivieron más de 60 días (figura 24B). La supervivencia media de animales portadores de xenoinjertos A1207.ΔEGFR también se prolongó de 24 días para los controles a 29 días (P <0,01; datos no mostrados).

55 Tratamiento con mAb806 inhibe el crecimiento de tumores cerebrales que sobreexpresan ΔEGFR

60 [0344] Los ratones que llevaban xenoinjertos U87MG. ΔEGFR y LN-Z308. ΔEGFR fueron sacrificados en el día 9 y 15, respectivamente. Se analizaron histopatológicamente las secciones de tumor y se determinaron los volúmenes tumorales. En consonancia con los resultados observados para la supervivencia animal, el tratamiento con mAb806 redujo significativamente los volúmenes en aproximadamente el 90% de xenoinjertos U87MG. ΔEGFR (P <0,001;

figura 24C) y LN-Z308. Δ EGFR en más de un 95% (P <0,001; figura 24D) en comparación con la de los grupos de control. Se obtuvieron resultados similares para los animales portadores de tumores A1207. Δ EGFR (reducción del volumen del 65%, P <0,01; datos no mostrados).

5 Tratamiento intratumoral con mAb806 prolonga la supervivencia de los ratones que llevan tumores de cerebro U87MG. Δ EGFR

[0345] También se determinó la eficacia de la inyección intratumoral directa de mAb806 para el tratamiento de xenoinjertos U87MG. Δ EGFR. Los animales recibieron inyecciones intratumorales de mAb806 o control de isotipo IgG un día después de la implantación. Los animales de control sobrevivieron durante 15 días, mientras que los ratones tratados con mAb806 se mantuvieron vivos durante 18 días (P <0,01; figura 24E). Aunque el tratamiento intratumoral con mAb806 era algo eficaz, implicaba las dificultades de múltiples inyecciones intracraneales y un mayor riesgo de infección. Por lo tanto, nos hemos centrado en los tratamientos sistémicos para estudios posteriores.

15 Tratamiento con mAb806 prolonga ligeramente la supervivencia de los ratones que llevan xenoinjertos intracraneales U87MG.wtEGFR pero no U87MG o U87MG.DK

[0346] Para determinar si la inhibición del crecimiento por mAb806 fue selectiva para los tumores que expresan Δ EGFR, se trataron animales que llevan xenoinjertos cerebrales U87MG, U87MG.DK (Δ EGFR deficiente en quinasa) y U87MG.wtEGFR. El tratamiento con mAb806 no prolongó la supervivencia de los ratones implantados con tumores U87MG (figura 25A) que expresaban un bajo nivel de EGFR de tipo salvaje (wtEGFR) endógeno (Huang et al. (1997) The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. J. Biol. Chem., 272, 2927-2935), o animales portadores de xenoinjertos U87MG.DK que sobreexpresan un Δ EGFR deficiente en quinasas en adición a un bajo nivel de wtEGFR endógeno (figura 25B). El tratamiento con mAb806 prolongó ligeramente la supervivencia de ratones portadores de tumores U87MG.wtEGFR (P <0,05, la supervivencia media de 23 días frente a 26 días para los grupos de control) que sobreexpresan wtEGFR (figura 25C).

30 Reactividad con mAb806 se correlaciona con la eficacia anti-tumoral in vivo.

[0347] Para entender el efecto diferencial de mAb806 en tumores que expresan diferentes niveles o diferentes tipos de EGFR, se determinó la reactividad con mAb806 con varias células tumorales mediante análisis FACS. Las células teñidas se analizaron con un FACS Calibur utilizando software Cell Quest (Becton-Dickinson Pharmingen). Para el primer anticuerpo, se utilizaron los siguientes mAbs: mAb806, mAb anti EGFR clon 528, y clon EGFR.1. Se utilizaron IgG2a o IgG2b de ratón control de isotipo.

[0348] De acuerdo con informes anteriores (Nishikawa et al. (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91, 7727-7731), el mAb528 anti-EGFR reconoció tanto Δ EGFR como wtEGFR y mostró una tinción más fuerte para las células U87MG. Δ EGFR en comparación con las células U87MG (figura 26A, 528).

[0349] En cambio, el anticuerpo EGFR.1 reaccionó con wtEGFR pero no con Δ EGFR (Nishikawara et al., 1994), porque las células U87MG. Δ EGFR eran tan débilmente reactivas como las células U87MG (figura 26A, el panel de EGFR.1).

[0350] Este anticuerpo EGFR.1 reaccionó con U87MG.wtEGFR más intensamente que con células U87MG, porque las células U87MG.wtEGFR sobreexpresaban wtEGFR (Figura 26A, panel EGFR.1). Aunque mAb806 reaccionó intensamente con células U87MG. Δ EGFR y U87MG.DK y no con células U87MG, reaccionó débilmente con U87MG.wtEGFR, lo que indicó que mAb806 es selectivo para Δ EGFR con una débil actividad cruzada con wtEGFR sobreexpresado (Figura .26A, panel mAb806).

[0351] Este nivel de reactividad con U87MG.wtEGFR era cuantitativamente y cualitativamente similar a la prolongación de la supervivencia media por el tratamiento con el anticuerpo (Figura 25C).

[0352] Se determinó además la especificidad de mAb806 mediante inmunoprecipitación. Se inmunoprecipitó EGFR en diferentes líneas celulares con anticuerpos mAb806, mAb anti-EGFR clon 528 (Oncogene Research Products, Boston, MA) o clon EGFR. (Oncogene Research Products).

[0353] Brevemente, las células se lisaron con tampón de lisis que contiene HEPES 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, 10% de glicerol, 1% Triton X-100, EDTA 2 mM, 0,1% SDS, 0,5% de desoxicolato de sodio, PPI de sodio 10 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, Na₃VO₄ 2 mM, 5 ug/ml de leupeptina, y 5 ug/ml de aprotinina. Los anticuerpos se incubaron con lisados de células a 4°C durante 1 h antes de la adición de proteína-A y G-Sefarosa. Los inmunoprecipitados se lavaron dos veces con tampón de lisis y una vez con tampón HNTG [HEPES 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, 0,1% Triton X-100, y 10% de glicerol], electroforesis, y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa.

[0354] Las transferencias de las proteínas separadas por electroforesis se sondaron con el anticuerpo anti-EGFR, C13 (proporcionado por el Dr. GN Gill, Universidad de California, San Diego, CA), que se utiliza para la detección de tanto EGFR de tipo salvaje como Δ EGFR en inmunotransferencias (Huang et al., 1997), y las proteínas se visualizaron usando el sistema de detección quimioluminiscente ECL (Amersham Pharmacia Biotech.). Los anticuerpos para Bcl-X (anticuerpo de conejo policlonal; Transduction Laboratories, Lexington, KY) y fosfotirosina (4G10, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) se utilizaron para el análisis de transferencia Western como se describió previamente (Nagane et al (1998) Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 5724-5729).

[0355] De acuerdo con el análisis FACS, el anticuerpo 528 reconoce wtEGFR y los receptores mutantes (Figura 26B panel IP: 528), mientras que el anticuerpo EGFR.1 reaccionó con wtEGFR pero no con las especies mutantes (Figura 26B, Panel de IP: EGFR.1). Por otra parte, los niveles de receptores mutantes en células U87MG. Δ EGFR y U87MG.DK son comparables con los de wtEGFR en las células U87MG.wtEGFR (Figura 26B, panel IP: 528).

[0356] Sin embargo, el anticuerpo mAb806 fue capaz de precipitar solamente una pequeña cantidad de wtEGFR de los lisados de células U87MG.wtEGFR en comparación con la cantidad más grande de receptor mutante precipitado de células U87MG. Δ EGFR y U87MG.DK, y una cantidad indetectable de las células U87MG (Figura 26B, panel IP: mAb806). Colectivamente, estos datos sugieren que mAb806 reconoce un epítipo en Δ EGFR que también existe en una pequeña fracción de wtEGFR solamente cuando se sobreexpresa en la superficie celular (ver discusión adicional y las referencias al epítipo mAb806 a continuación).

Tratamiento con mAb806 reduce la autofosforilación de Δ EGFR regula por disminución la expresión de Bcl.XL en tumores cerebrales U87MG. Δ EGFR

[0357] Los mecanismos que subyacen a la inhibición del crecimiento por mAb806 fueron investigados a continuación. Dado que la actividad de la quinasa constitutivamente activa y la autofosforilación del extremo carboxilo de Δ EGFR son esenciales para sus funciones biológicas (Nishikawa et al (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 7727-7731; Huang et al, 1997; Nagane et al (1996) A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis. Cancer Res, 56, 5079-5086; Nagane et al (2001) Aberrant receptor signaling in human malignant gliomas: mechanisms and therapeutic implications. Cancer Lett 162 (Suppl.1), S17-S21), se determinó el estado de fosforilación de Δ EGFR en los tumores de los animales tratados y de control. Como se muestra en la Figura 27A, el tratamiento con mAb806 reduce drásticamente la autofosforilación de Δ EGFR, aunque los niveles de los receptores se redujeron ligeramente en los xenoinjertos tratados con mAb806. Hemos demostrado anteriormente que la autofosforilación del receptor provoca la regulación del gen antiapoptótico, Bcl-XL, que desempeña un papel clave en la reducción de la apoptosis de los tumores con sobreexpresión de Δ EGFR (Nagane et al., 1996; Nagane et al, 2001). Por lo tanto, el efecto del tratamiento con mAb806 en la expresión de Bcl-XL se determinó a continuación. Los tumores de Δ EGFR de animales tratados con mAb806 mostraron de hecho niveles reducidos de Bcl-XL (Figura 27A).

Tratamiento con mAb806 disminuye el crecimiento y la angiogénesis, y aumenta la apoptosis en tumores U87MG. Δ EGFR

[0358] A la luz de la supresión in vivo causada por el tratamiento con mAb806 y sus efectos bioquímicos sobre la señalización del receptor, se determinó la tasa de proliferación de los tumores de ratones de control o tratados. El índice proliferativo, medido mediante tinción con Ki-67 de los tumores tratados con mAb806, fue significativamente menor que el de los tumores de control (P <0,001; Figura 28).

[0359] Brevemente, para evaluar la angiogénesis en los tumores, se fijaron en una solución que contiene cloruro de zinc, se embebieron en parafina, se seccionaron, y se inmunotñieron utilizando un anticuerpo monoclonal de rata anti-ratón CD31 (Becton-Dickinson PharMingen; 1:200). La evaluación de la proliferación de células tumorales se realizó por inmunohistoquímica con Ki-67 en tejidos tumorales embebidos en parafina y fijados con formalina. Después de la desparafinación y rehidratación, las secciones de tejido se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol para inactivar la peroxidasa endógena. Las secciones se bloquearon durante 30 min con suero de cabra y se incubaron durante la noche con el anticuerpo primario a 4°C. Las secciones se lavaron a continuación con PBS y se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado durante 30 min. Después de varios lavados con PBS, los productos se visualizaron utilizando peroxidasa de rábano picante con estreptavidina y con diaminobencidina como cromógeno y hematoxilina como contratinción. Como medida de la proliferación, el índice de marcaje con Ki-67 se determinó como la relación de núcleos marcados:totales en campos de alta potencia (3400).

[0360] Se contaron aproximadamente 2.000 núcleos en cada caso por muestreo aleatorio sistemático. Para la tinción de macrófagos y células NK, las secciones congeladas, fijadas con solución de paraformaldehído tamponado al 4%, se inmunotñieron utilizando mAbF4/80 biotinilado (Serotec, Raleigh, NC) y anticuerpos policlonal de conejo anti-asialo GM1 (DAKO Chemicals, Richmond, VA), respectivamente. La angiogénesis se cuantificó como área del

recipiente utilizando un análisis computarizado. Para este propósito, las secciones se inmunotñieron utilizando anti-CD31 y se analizaron utilizando un sistema de análisis de imagen computarizado sin contratincción. Se determinaron MVA mediante la captura de imágenes digitales de las secciones a 3200 aumentos utilizando una cámara de color CCD como se ha descrito previamente (Mishima et al., 2000). Las imágenes se analizaron a continuación utilizando el software Image Pro Plus versión 4.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) y se determinó MVA midiendo la cantidad total de tinción en cada sección. Se evaluaron cuatro campos para cada diapositiva. Este valor se representa como un porcentaje de la superficie total en cada campo. Los resultados fueron confirmados en cada experimento por por lo menos dos observadores (K.M., H-J. S.H.).

[0361] Además, las células apoptóticas en el tejido tumoral se detectaron mediante el método de TUNEL como se describió previamente (Mishima et al., 2000). Las células positivas de TUNEL se contaron a X400. El índice apoptótico se calculó como una relación del número de células apoptóticas:número total de células en cada campo. El análisis del índice de apoptosis a través de la tinción de TUNEL demostró un aumento significativo en el número de células apoptóticas en los tumores tratados con mAb806 en comparación con los tumores de control (P <0,001; Figura 28).

[0362] El grado de vascularización de tumor también se analizó mediante inmunotinción de los tumores de las muestras tratadas y de control para CD31. Para cuantificar la vascularización del tumor, se midieron las zonas microvasculares (AVM) usando análisis de imagen computerizado. Los tumores tratados con mAb806 mostraron 30% menos de MVA que los tumores de control (P <0,001; figura 28).

[0363] Para comprender si la interacción entre el receptor y el anticuerpo puede provocar una respuesta inflamatoria, se tiñeron secciones de tumor para el marcador de macrófagos, F4/80, y el marcador de células NK, asialo GM1. Se identificaron macrófagos por toda la matriz tumoral y especialmente acumulado alrededor de la periferia del tumor U87MG.ΔEGFR tratado con mAb806 (Figura 28). Hemos observado pocas células NK infiltradas en y alrededor de los tumores y ninguna diferencia significativa entre tumores tratados con mAb806 y los tumores de control de isotipo (datos no mostrados).

Ejemplo 17

Inmunoterapia de combinación con mAb806 y mAb528

[0364] Los experimentos expuestos en este documento se describe en el trabajo in vivo diseñado para determinar la eficacia de los anticuerpos de acuerdo con esta descripción.

[0365] Se utilizaron ratones desnudos hembra, de 4-6 semanas de edad, como animales de experimentación. Los ratones recibieron inoculaciones subcutáneas de 3×10^6 células tumorales en cada uno de sus flancos.

[0366] Los animales recibieron células U87MG.D2-7, U87MG.DK o A431 células, las cuales se describen supra. La terapia comenzó cuando los tumores habían crecido hasta un tamaño suficiente.

[0367] Los ratones entonces recibieron inyecciones de una de (i) solución salina tamponada con fosfato, (ii) mAb806 (0,5 mg/inyección), (iii) mAb528 (0,5 mg/inyección), o (iv) una combinación de ambos mAbs. Con respecto a "(iv)", diferentes grupos de ratones recibieron 0,5 mg/inyección de cada mAb, o 0,25 mg/inyección de cada mAb.

[0368] El primer grupo de ratones examinados eran los que habían recibido inyecciones U87MG.D2-7. El protocolo de tratamiento comenzó 9 días después de la inoculación, y continuó 3 veces por semana durante 2 semanas (es decir, los animales fueron inoculados 9, 11, 13, 16, 18 y 20 días después de cuando fueron inyectados con las células). Al inicio del protocolo de tratamiento, el diámetro medio del tumor fue de 115 mm^3 . Cada grupo contenía 50 ratones, cada uno con dos tumores.

[0369] Dentro del grupo de ratones que recibieron la combinación de anticuerpos (0,5 mg/inyección de cada uno), hubo tres regresiones completas. No hubo regresiones en cualquiera de los otros grupos. La figura 18A muestra los resultados gráficamente.

[0370] En un segundo grupo de ratones, los materiales inyectados fueron los mismos, excepto que la terapia de combinación contenía 0,25 mg de cada anticuerpo por inyección. Las inyecciones se administraron 10, 12, 14, 17, 19 y 21 días después de la inoculación con las células. Al inicio de la terapia el tamaño medio del tumor fue de 114 mm^3 . Los resultados se muestran en la figura 18B.

[0371] El tercer grupo de ratones recibió inoculaciones de U87MG.DK. Las inyecciones terapéuticas comenzaron 18 días después de la inoculación con las células, y continuaron en los días 20, 22, 25, 27 y 29. El tamaño medio del tumor al inicio del tratamiento fue de 107 mm^3 . La figura18C resume los resultados. Las inyecciones terapéuticas eran las mismas que en el primer grupo.

[0372] Finalmente, el cuarto grupo de ratones, que habían sido inoculados con células A431, recibieron inyecciones como en los grupos I y III, a los 8, 10, 12 y 14 días después de la inoculación. Al principio, el tamaño medio del tumor fue de 71 mm³. Los resultados se muestran en la Figura18D.

5 [0373] Los resultados indicaron que la terapia de combinación de anticuerpos mostró un efecto sinérgico en la reducción de tumores. Ver la figura 18A. Un efecto similar se observó con una dosis inferior, como en la figura 18B, lo que indica que el efecto no se debe simplemente a los niveles de dosificación.

10 [0374] La terapia de combinación no inhibió el crecimiento de U87MG.DK (Figura18C), lo que indica que la función inmune del anticuerpo no fue la causa de la disminución observada en las figuras 18A y 18B.

15 [0375] Hay que señalar que, como se muestra en la figura 18D, la terapia de combinación también mostró una eficacia sinérgica sobre los tumores A431, con 4 dosis que conducen a una tasa de respuesta completa del 60%. Estos datos sugieren que la molécula de EGFR reconocida por mAb806 es funcionalmente diferente de la que inhibida por 528.

Ejemplo 18

Inhibición por mAb806 del crecimiento de xenoinjertos tumorales

20 [0376] Como se discute aquí, y se demostrado y discute a fondo en este ejemplo, se ha encontrado que inesperadamente mAb806 inhibe el crecimiento de xenoinjertos tumorales que expresan EGFRde2-7 o EGFR amplificado, pero no EGFR de tipo salvaje.

25 [0377] Se prepararon líneas celulares y anticuerpos como se describe en el Ejemplo 1. Para determinar la especificidad de mAb806, su unión a células U87MG, U87MG.D2-7, y U87MG.wtEGFR se analizó por FACS. Brevemente, se analizaron líneas celulares parentales cultivadas y transfectadas de U87MG para la expresión de tipo salvaje y de2-7EGFR utilizando los anticuerpos 528, 806, y DH8.3. Las células (1 3 10 6) se incubaron con 5 ug/ml del anticuerpo apropiado o un control negativo del mismo isotipo en PBS que contenía 1% de HSA durante 30 minutos a 4°C. Después de tres lavados con PBS/1% de HSA, las células se incubaron 30 min adicionales a 4°C con anticuerpo anti-ratón de cabra acoplado a FTTC (dilución 1:100; Calbiochem, San Diego, CA). Después de tres lavados posteriores, se analizaron las células en un Epics Elite ESP (Beckman Coulter, Hialeah, FL) mediante la observación de un mínimo de 20.000 eventos y se analizaron utilizando EXPO (versión 2) para Windows. Se incluyó una IgG2b irrelevante (mAb 100-310 dirigido al antígeno A33 humano) como un control de isotipo para mAb806, y el anticuerpo 528 se incluyó porque reconoce tanto de2-7 como wtEGFR.

35 [0378] Solamente el anticuerpo 528 fue capaz de teñir la línea celular U87MG parental (Figura 29), consistente con informes anteriores que demuestran que estas células expresan el wtEGFR (Nishikawa et al. (1994) A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 7727-7731). mAb806 tenía niveles similares a la unión a anticuerpo de control, demostrando claramente que es incapaz de unirse a wtEGFR (figura 29). La unión del anticuerpo de control de isotipo a las líneas celulares U87MG.D2-7 y U87MG.wtEGFR fue similar a la observada para las células U87MG. mAb806 tiñó las células U87MG.D2-7 y U87MG.wtEGFR, indicando que mAb806 reconoció específicamente el EGFR de2-7 y un subconjunto de EGFR sobreexpresado (figura 29). Como era de esperar, el anticuerpo 528 tiñó tanto las líneas celulares U87MG.D2-7 como U87MG.wtEGFR (Figura29). La intensidad de la tinción de anticuerpos 528 en células U87MG.wtEGFR fue mucho mayor que mAb806, lo que sugiere que mAb806 sólo reconoce una parte del EGFR sobreexpresado. La reactividad con mAb806 observada con células U87MG.wtEGFR es similar a la obtenida con las células A431, otra línea celular que sobreexpresa wtEGFR.3

40 [0379] Se realizó un análisis de Scatchard usando células U87MG.D2-7 y A431 para determinar la afinidad relativa y sitios de unión para mAb806 en cada línea celular. mAb806 tenía una afinidad por el receptor de2-7EGFR de $1,1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ y reconoció un promedio (tres experimentos separados) de $2,4 \times 10^5$ sitios de unión/célula, tal como se ha indicado en el Ejemplo 4. Por el contrario, la afinidad de mAb806 para el wtEGFR en células A431 fue solamente de $9,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, tal como se ha indicado en el Ejemplo 8. Curiosamente, mAb806 reconoció $2,3 \times 10^5$ sitios de unión en la superficie de A431, que es un poco de 10 veces menor que el número indicado de EGFR encontrados en estas células. Para confirmar el número de EGFR en la superficie de las células A431, se realizó un análisis de Scatchard utilizando anticuerpo 528 marcado con ¹²⁵I. Como se esperaba, este anticuerpo se unió a aproximadamente 2×10^6 sitios en la superficie de las células A431. Por lo tanto, parece que mAb806 sólo se une a una parte de los receptores EGFR en la superficie de las células A431. Es importante destacar que, mAb806 marcado con ¹²⁵I no se unió a las células U87MG parentales en absoluto, incluso cuando el número de células se incrementó a 1×10^7 .

50 [0380] La reactividad con mAb806 se caracterizó adicionalmente en diversas líneas celulares por inmunoprecipitación después del marcaje con ³⁵S usando mAb806, sc-03 (un anticuerpo policlonal comercial específico para el dominio COOH-terminal del EGFR) y un control de isotipo IgG2b. Brevemente, las células se marcaron durante 16 h con 100 mCi/ml de marcador ³⁵S Tran (ICN Biomedicals, Irvine, CA) en DMEM sin metionina/cisteína suplementado con FCS dializado al 5%. Después de lavar con PBS, las células se colocaron en

tampón de lisis (1% Triton X-100, 30 mM HEPES, NaCl 150 mM, fluoruro de 4-(2-aminoetil)bencenosulfonilo (AEBSF) 500 μ M, aprotinina 150 nM, inhibidor de la proteasa E-64 1 μ M, EDTA 0,5 mM, y leupeptina 1 μ M, pH 7,4) durante 1 hora a 4°C. Los lisados se depuraron por centrifugación durante 10 min a 12.000 g y después se incubaron con 5 μ g de anticuerpo apropiado durante 30 min a 4°C antes de la adición de Proteína A-Sepharose. Los inmunoprecipitados se lavaron tres veces con tampón de lisis, se mezclaron con tampón de muestra SDS, se separaron por electroforesis en gel usando un gel de 4-20% Tris/glicina que a continuación se secó, y se expusieron a película de rayos X.

[0381] El anticuerpo sc-03 inmunoprecipitó tres bandas de células U87MG. Δ 2-7; un doblete correspondiente a las 2 bandas de EGFR de2-7 observadas en estas células y una banda de peso molecular más elevado correspondiente al wtEGFR (figuras 22 y 30). En cambio, aunque mAb806 inmunoprecipitó las dos bandas de EGFR de2-7, el wtEGFR estaba completamente ausente. El patrón observado en células U87MG.wtEGFR y A431 fue esencialmente idéntico. El anticuerpo sc-03 inmunoprecipitó una sola banda correspondiente a wtEGFR de células A431 (figuras 22 y 30). mAb806 también inmunoprecipitó una sola banda correspondiente a wtEGFR tanto de células U87MG.wtEGFR como células A431 (figuras 22 y 30). Consistente con los datos de FACS y Scatchard, la cantidad de EGFR inmunoprecipitado por mAb806 fue sustancialmente menor que el EGFR total presente en la superficie celular. Dado que mAb806 y sc-03 inmunoprecipitaron cantidades similares de EGFR de2-7, este resultado apoya la idea de que el anticuerpo mAb806 sólo reconoce una parte de EGFR en las células que sobreexpresan el receptor. Las comparaciones entre mAb806 y el anticuerpo 528 mostraron un patrón idéntico de reactividad (datos no mostrados). Una IgG2b irrelevante (un control de isotipo para mAb806) no inmunoprecipitó EGFR de cualquiera de las líneas de células (figuras 22 y 30). Utilizando condiciones idénticas, mAb806 no inmunoprecipitó el EGFR de las células U87MG parentales (datos no mostrados).

[0382] También se examinó mAb806 por la eficacia contra los tumores U87MG y U87MG. Δ 2-7 en un modelo de xenoinjerto preventivo. Se administró i.p. anticuerpo o vehículo el día antes de la inoculación del tumor y se administró tres veces por semana durante 2 semanas. A una dosis de 1 mg/inyección, mAb806 no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de xenoinjertos U87MG parentales que expresan wtEGFR (Figura 9a). En cambio, mAb806 inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos de U87MG. Δ 2-7 en una forma dependiente de la dosis (Figura 9b). Veinte días después de la inoculación del tumor, cuando se sacrificaron los animales de control, el volumen tumoral promedio era de 1600 ± 180 mm³ para el grupo de control, significativamente menor 500 ± 95 mm³ para el grupo de 0,1 mg/inyección ($P < 0,0001$) y 200 ± 42 mm³ para el grupo de 1 mg/inyección ($P < 0,0001$). Los grupos de tratamiento fueron sacrificados en el día 24, momento en el que los volúmenes tumorales promedio eran 1300 ± 240 mm³ para el grupo tratado con 0,1 mg y 500 ± 100 mm³ para el grupo de 1 mg ($P < 0,005$).

[0383] Dada la eficacia de mAb806 en el modelo de xenoinjerto preventivo, se examinó su capacidad para inhibir el crecimiento de xenoinjertos de tumores establecidos. El tratamiento con anticuerpo fue tal como se describe en el modelo preventivo, excepto que comenzó cuando los tumores habían alcanzado un volumen tumoral promedio de 65 mm³ (10 días después de la implantación) para los xenoinjertos U87MG. Δ 2-7 y 84 mm³ (19 días después de la implantación) para los xenoinjertos U87MG parentales (véase el ejemplo 10). Una vez más, mAb806 no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de xenoinjertos U87MG parentales, incluso a una dosis de 1 mg/inyección (Figura 10A). En cambio, mAb806 inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos de U87MG. Δ 2-7 en una forma dependiente de la dosis (figura 10B). El día 17, un día antes se sacrificaron los animales de control, el volumen tumoral promedio fue de 900 ± 200 mm³ para el grupo de control, 400 ± 60 mm³ para el grupo de 0,1 mg/inyección ($P < 0,01$) y 220 ± 60 mm³ para el grupo de 1 mg/inyección ($P < 0,002$). El tratamiento de xenoinjertos U87MG. Δ 2-7 con un control de isotipo IgG2b no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento tumoral (datos no mostrados).

[0384] Para examinar si la inhibición del crecimiento observada con mAb806 estaba restringida a las células que expresan EGFR de2-7, también se examinó su eficacia contra los xenoinjertos U87MG.wtEGFR en un modelo establecido. Estas células sirven como modelo para tumores que contienen la amplificación del gen de EGFR sin la expresión de EGFR de2-7. El tratamiento con mAb806 comenzó cuando los tumores habían alcanzado un volumen tumoral promedio de 73 mm³ (22 días después de la implantación). mAb806 inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos U87MG.wtEGFR establecidos cuando se comparó con tumores de control tratados con vehículo (Figura 10C). En el día en el que los animales de control fueron sacrificados, el volumen tumoral promedio fue de 1000 ± 300 mm³ para el grupo control y 500 ± 80 mm³ para el grupo tratado con 1 mg/inyección ($P < 0,04$).

[0385] Para evaluar posibles diferencias histológicas entre xenoinjertos U87MG. Δ 2-7 y U87MG.wtEGFR tratados con mAb806 y control 2-7, se tiñeron secciones fijadas en formol, embebidas en parafina con H & E (Figura 31). Las áreas de necrosis se observaron en secciones de xenoinjertos U87MG. Δ 2-7 tratados con mAb806 (los xenoinjertos tratados con mAb806 se recogieron 24 días después de la inoculación del tumor y los xenoinjertos tratados con vehículo a los 18 días), y xenoinjertos U87MG.wtEGFR tratados con (los xenoinjertos tratados con mAb806 se recogieron 42 días después de la inoculación del tumor y los xenoinjertos tratados con vehículo a los 37 días; Figura 31). Este resultado se observó consistentemente en una serie de xenoinjertos de tumores ($n = 4$ para cada línea celular). Sin embargo, las secciones de los xenoinjertos U87MG. Δ 2-7 y U87MG.wtEGFR tratados con vehículo ($n = 5$) no mostraron las mismas áreas de necrosis observadas después del tratamiento con mAb806 (Figura 31). Los xenoinjertos tratados con vehículo y mAb806 extraídos a tiempos idénticos también mostraron estas diferencias

en la necrosis del tumor (datos no mostrados). Por lo tanto, el aumento de la necrosis observado no fue causada por los períodos de crecimiento más largos utilizados para los xenoinjertos tratados con mAb806. Además, las secciones de xenoinjertos U87MG tratados con mAb806 también se tiñeron con H & E y no revelaron áreas de necrosis (datos no presentados), apoyando adicionalmente la hipótesis de que la unión de mAb806 induce una disminución de la viabilidad celular, lo que resulta en un aumento de la necrosis en xenoinjertos tumorales.

[0386] Se realizó un análisis inmunohistoquímico de secciones de xenoinjertos de U87MG, U87MG.Δ2-7, y U87MG.wtEGFR para determinar los niveles de expresión de Δ2-7 y wtEGFR después del tratamiento con mAb806 (Figura 32). Como era de esperar, el anticuerpo 528 tiñó todas las secciones de xenoinjertos con una disminución no obvia en intensidad entre tumores tratados y de control (Figura 32). La tinción de secciones de U87MG fue indetectable con mAb806; sin embargo, se observó tinción positiva de secciones de los xenoinjertos de U87MG.Δ2-7 y U87MG.wtEGFR (Figura 32). No hubo diferencia en intensidad de la tinción de mAb806 entre los xenoinjertos de U87MG.Δ2-7 y U87MG.wtEGFR tratados y de control, lo que sugiere que el tratamiento con anticuerpos no conduce a la selección de variantes clonales que carecen de reactividad con mAb806.

[0387] Para demostrar que los efectos antitumorales de mAb806 no estaban restringidos a las células U87MG, el anticuerpo se administró a ratones que contenían los xenoinjertos de A431. Estas células contienen un gen de EGFR amplificado y expresan aproximadamente 2×10^6 receptores/células. Hemos demostrado anteriormente que mAb806 se une a ~ 10% de estos EGFR y reconoce xenoinjertos de A431 (García et al. (1993) Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell along carcinomas. Cancer Res. 53, 3.217-3.220). mAb806 inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos de A431 cuando se examina en el modelo de xenoinjerto preventivo descrito previamente (figura 11A). En el día 13, cuando se sacrificaron los animales de control, el volumen tumoral promedio fue de $1400 \pm 150 \text{ mm}^3$ en el grupo tratado con vehículo y $260 \pm 60 \text{ mm}^3$ para el grupo de tratamiento de 1 mg/inyección ($P < 0,0001$). En un experimento separado, una dosis de 0,1 mg de mAb también inhibió significativamente ($P < 0,05$) el crecimiento de xenoinjertos de A431 en un modelo preventivo (datos no mostrados) (véase el Ejemplo 10).

[0388] Dada la eficacia de mAb806 en el modelo de xenoinjerto de A431 preventivo, se examinó su capacidad para inhibir el crecimiento de xenoinjertos de tumores establecidos. El tratamiento con anticuerpo fue como el descrito en el modelo preventivo, excepto que no se inició hasta que los tumores habían alcanzado un volumen tumoral promedio de $200 \pm 20 \text{ mm}^3$. mAb806 inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos de A431 establecidos (Figura 11B). El día 13, el día en el que los animales de control fueron sacrificados, el volumen tumoral promedio fue de $1100 \pm 100 \text{ mm}^3$ para el grupo control y $450 \pm 70 \text{ mm}^3$ para el grupo de 1 mg/inyección ($P < 0,0001$).

Ejemplo 19

Construcción, expresión y análisis de anticuerpos quiméricos 806

[0389] Los anticuerpos quiméricos son una clase de moléculas en las que las regiones variables de cadena pesada y ligera, por ejemplo, de un ratón, rata o de otras especies se unen a regiones de cadena pesada y ligera humanas. Los anticuerpos quiméricos se producen de forma recombinante. Una ventaja de los anticuerpos quiméricos es que pueden reducir los efectos xenoantigénicos, la inmunogenicidad inherente de anticuerpos no humanos (por ejemplo, ratón, rata o de otras especies). Además, los anticuerpos quiméricos preparados de forma recombinante a menudo se pueden producir en grandes cantidades, particularmente cuando se utilizan vectores de expresión de alto nivel.

[0390] Para la producción a alto nivel, el sistema de expresión de mamíferos más ampliamente utilizado es uno que utiliza el procedimiento de amplificación de genes ofrecido por células de ovario de hámster chino deficiente en deshidrofolato reductasa ("dhfr-"). El sistema es bien conocido para el experto en la materia. El sistema se basa en el gen de la deshidrofolato reductasa "dhfr", que codifica la enzima DHFR, que cataliza la conversión de deshidrofolato a tetrahidrofolato. Con el fin de lograr una alta producción, las células dhfr-CHO son transfectadas con un vector de expresión que contiene un gen de DHFR funcional, junto con un gen que codifica una proteína deseada. En este caso, la proteína deseada es un anticuerpo recombinante de cadena pesada y/o cadena ligera.

[0391] Al aumentar la cantidad de metotrexato (MTX) inhibidor competitivo de la DHFR, las células recombinantes desarrollan resistencia mediante la amplificación del gen dhfr. En los casos normales, la unidad de amplificación empleada es mucho más grande que el tamaño del gen dhfr, y como resultado la cadena pesada del anticuerpo es coamplificada.

[0392] Cuando se desea la producción a gran escala de la proteína, tal como la cadena de anticuerpo, tanto el nivel de expresión como la estabilidad de las células que se emplean, son críticos. En un cultivo a largo plazo, las poblaciones de células CHO recombinantes pierden homogeneidad con respecto a su productividad de anticuerpo específico durante la amplificación, a pesar de que se derivan de un único clon parental.

[0393] Los vectores de expresión bicistrónicos se prepararon para su uso en la expresión recombinante de los anticuerpos quiméricos. Estos vectores de expresión bicistrónicos emplean un "sitio interno de entrada ribosomal" o "IRES". En estas construcciones para la producción de anti-EGFR quimérico, las cadenas de inmunoglobulina y

ADNc de marcadores seleccionables se unen a través de un IRES. IRES son elementos que actúan en cis que reclutan las pequeñas subunidades ribosómicas a un codón iniciador intern en el ARNm con la ayuda de factores celulares que actúan en trans. IRES facilita la expresión de dos o más proteínas a partir de una unidad de transcripción policistónica en células eucariotas. El uso de vectores de expresión bicistónicos en el que el gen marcador seleccionable se traduce en una manera dependiente del bloqueo, y el gen de interés en una manera dependiente de IRES, se ha aplicado a una variedad de métodos experimentales. Los elementos IRES se han incorporado con éxito en vectores para la transformación celular, la producción de animales transgénicos, la producción de proteínas recombinantes, la terapia génica, la captura de genes, y el reconocimiento de genes.

10 Sinopsis de la construcción de anticuerpo quimérico 806 (ch806)

15 **[0394]** El anticuerpo quimérico 806 se generó por clonación de las cadenas VH y VL del anticuerpo 806 a partir del hibridoma murino parental usando técnicas estándar de biología molecular. Las cadenas VH y VL fueron clonadas en los vectores de expresión de mamífero pREN, la construcción de los cuales se muestran en SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, y se transfectaron en células CHO (DHFR-/-ve) para la amplificación y expresión. Brevemente, después de la tripsinización 4×10^6 células CHO fueron cotransferidas con 10 ug de cada uno de los vectores de expresión de LC y HC utilizando electroporación en condiciones estándar. Después de un período de descanso de 10 min a temperatura ambiente, se añadieron las células a 15 ml de medio (10% de suero de ternera fetal, suplemento de hipoxantina/timidina con aditivos) y se transfirieron a placas de Petri de cultivo celular de 15×10 cm. Las placas se colocaron a continuación en la incubadora en condiciones normales durante 2 días.

20 **[0395]** En este punto, la adición de gentamicina, metotrexato 5 nM, la sustitución de suero de ternera fetal por suero de ternera fetal dializado y la eliminación de hipoxantina/timidina, inició la selección de clones que fueron transfectados con éxito con LC y HC del medio. En el día 17 después de la transfección, los clones individuales que crecen bajo selección fueron recogidos y evaluados para la expresión del anticuerpo quimérico 806. Se utilizó un ELISA para el cribado y consistió en recubrir una placa de ELISA con el receptor de EGF soluble desnaturalizado (se sabe que EGFR desnaturalizado permite la unión a 806). Este ensayo permite el cribado de los niveles de producción de clones individuales y también para la funcionalidad del anticuerpo que se criba. Se observó que todos los clones producían ch806 funcional y se tomó el mejor productor y se expandió para la amplificación. Para amplificar el nivel de ch806 que se produce, el clon de producción más alta se sometió a la reselección bajo una concentración de metotrexato más alta (100 nM vs. 5 nM). Esto se llevó a cabo utilizando los procedimientos antes mencionados.

35 **[0396]** Los clones que crecen a MTX 100 nM se pasaron a la Instalación de Producción Biológica, Ludwig Institute, Melbourne, Australia para la medición de los niveles de producción, disminución del suero, el banco de células. Se ha observado que la línea celular produce de forma estable ~ 10 mg/litro en botellas de rodillos.

40 **[0397]** La secuencia de ácido nucleico del vector neo de LC de ch806 de pREN se proporciona en SEQ ID NO: 7. La secuencia de ácido nucleico del vector DHFR de HC de ch806 de pREN se proporciona en SEQ ID NO: 8.

45 **[0398]** La figura 33 representa los vectores pREN-HC y pREN-LC que emplean un IRES. El sistema de vector bicistónico pREN se describe y se da a conocer en la solicitud de Patente de Estados Unidos No. 60/355.838 presentada el 13 de febrero de 2002.

50 **[0399]** Se evaluó ch806 por análisis de FACS para demostrar que 806 quimérico muestra una especificidad de unión idéntica a la del anticuerpo murino parental. El análisis se realizó utilizando células de tipo salvaje (células U87MG parentales), células que sobreexpresan el receptor de EGF (células A431 y células UA87.wtEGFR) y células UA87.Δ2-7 (datos no presentados). Se obtuvo especificidad de unión similares de mAb806 y ch806 utilizando células que sobreexpresan EGFR y células que expresan el EGFR de2-7. No se observó unión en las células de tipo salvaje. El análisis de Scatchard reveló una afinidad de unión para ch806 radiomarcado de $6,4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ utilizando células U87MGde2-7 (datos no mostrados).

55 **[0400]** Se realizó un análisis de biodistribución del anticuerpo ch806 en ratones BALB/c desnudos portadores de tumores de xenoinjertos U87MG-de2-7, y los resultados se muestran en la figura 34. Los ratones fueron inyectados con 5 ug de anticuerpo radiomarcado y se sacrificaron en grupos de cuatro por cada punto de tiempo a las 8, 24, 48 y 74 horas. Los órganos se recogieron, se pesaron y se midió la radiactividad en un contador gamma. ch806 marcado con ^{125}I muestra un direccionamiento al tumor reducido en comparación con ch806 marcado con ^{111}In que tiene una alta captación tumoral y una alta retención del tumor acumulada durante el período de tiempo 74 horas. A las 74 horas, el anticuerpos marcado con ^{111}In muestra aproximadamente el 30% de ID/gramo de tejido y una relación de tumor a sangre de 4,0 (figura 35). El ch806 marcado con ^{111}In muestra cierta retención no específica en el hígado, bazo y riñones. Esto es común para el uso de este isótopo y disminuye con el tiempo, lo que apoya que esta unión es no específica para ch806 y es debido a la unión a ^{111}In .

65 **[0401]** El anticuerpo quimérico ch806 se evaluó para la eficacia terapéutica en un modelo de tumor establecido. Se inocularon s.c. 3×10^6 células U87MG.Δ2-7 en 100 ul de PBS en ambos flancos de ratones desnudos hembra de 4-6 semanas de edad (Centro de Investigación Animal, Australia Occidental, Australia). El mAb806 se incluyó como un

control positivo. Los resultados se representan en la figura 36. El tratamiento se inició cuando los tumores habían alcanzado un volumen promedio de 50 mm³ y consistía en 1 mg de ch806 o mAb806 administrados i.p. para un total de 5 inyecciones en los días indicados. El volumen del tumor en mm³ se determinó usando la fórmula (longitud X anchura²)/2, donde la longitud era el eje más largo y la anchura de la medición en ángulo recto con la longitud. Los datos se expresaron como el volumen tumoral promedio ± SE para cada grupo de tratamiento. El ch806 y el mAb806 mostraron actividad anti-tumoral casi idéntica contra los xenoinjertos U87MG.Δ2-7.

Análisis de la función efectora inmune de Ch806

10 Materiales y métodos

Anticuerpos y líneas celulares

15 **[0402]** Se prepararon mAb806 monoclonal anti-EGFR de2-7 murino, anticuerpo quimérico (IgG1) y anticuerpo monoclonal anti-G250 quimérico cG250 emparejado con isotipo de control la Instalación para la Producción Biológica, Instituto Ludwig para la Investigación del Cáncer, Melbourne, Australia. Los ensayos de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) utilizan células U87MG.de2-7 y células A431 como células diana. La línea celular U87MG.de2-7 descrita anteriormente es una línea celular de astrocitoma humano infectada con un retrovirus que contiene de2-7EGFR (Nishikawa et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 7727-31). Se adquirieron células A431 de carcinoma escamoso humano de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Todas las líneas celulares se cultivaron en DMEM/F-12 con Glutamax (Life Technologies, Melbourne, Australia) suplementado con FCS inactivado por calor al 10% (CSL, Melbourne, Australia), 100 unidades/ml de penicilina y 100 ug/ml de estreptomina. Para mantener la selección de células U87MG.de2-7 transfectadas retroviralmente, se incluyeron 400 ug/ml de G418 en el medio.

25

Preparación de células efectoras de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC)

30 **[0403]** Se aislaron PBMCs de sangre de donantes voluntarios sanos. La sangre entera heparinizada se fraccionó por centrifugación de densidad en Ficoll-Hypaque (ICN Biomedical Inc., Ohio, EE.UU.). Se recogieron fracciones de PBMC y se lavaron tres veces con RPMI+ 1640 suplementado con 100 U/ml de penicilina y 100 ug/ml de estreptomina, L-glutamina 2 mM, que contiene FCS inactivado por calor al 5%.

Preparación de células diana

35 **[0404]** Se realizaron ensayos CDC y ADCC mediante una modificación de un método previamente publicado (Nelson, DL et al (1991) En: Coligan JE, Kruisbeek AM, DD Margulies, EM Shevach, y W. Strober (eds), Current Protocols in Immunology, pp 7.27.1 Nueva York: Greene Publishing Wiley Interscience). Brevemente, se marcaron 5 X 10⁶ células U87MG.de2-7 diana y células A431 con 50 uCi⁵¹Cr (Geneworks, Adelaide, Australia) por 1 X 10⁶ células y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Las células se lavaron a continuación tres veces con PBS (0,05 M, pH 7,4) y un cuarto de lavado con medio de cultivo. Se añadieron alícuotas (1 X 10⁴ células/50 ul) de las células marcadas a cada pocillo de placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca).

40

Ensayo de CDC

45 **[0405]** A 50 ul de células diana marcadas, se añadieron 50 ul de ch806 o anticuerpo de control de isotipo cG250 por triplicado sobre el rango de concentraciones de 0,00315 - 10 ug/ml, y se incubaron en hielo 5 min. Se añadieron cincuenta ul de complemento de donante sano recién preparado (suero) para producir una dilución final 1:3 del suero. Las placas de microtitulación se incubaron durante 4 horas a 37°C. Después de la centrifugación, se contó el ⁵¹Cr liberado en el sobrenadante (contador gamma automatizado Cobra II, Canberra Packard, Melbourne, Australia). El porcentaje de lisis específica se calculó a partir de la liberación de ⁵¹Cr experimental, la liberación total (50 ul de células diana + 100 ul Tween 20 al 10%) y espontánea (50 ul de células diana + 100 ul de medio) de liberación.

50

Ensayo de ADCC

55 **[0406]** La ADCC mediada por ch806 efectuada por PBMC de donante sano se midió mediante dos ensayos de liberación de ⁵¹Cr en 4 horas. En el primer ensayo, las células diana marcadas se sembraron con las células efectoras en microplacas de 96 pocillos de base "U" (Nunc, Roskilde, Dinamarca) a relaciones de células efectoras/diana (E:T) de 50: 1. Para mediciones de la actividad de ADCC, se añadieron 0,00315 - 10 ug/ml (concentración final) de anticuerpos de prueba y de control por triplicado a cada pocillo. En el segundo ensayo de ADCC, la actividad ADCC de ch806 se comparó con el mAb806 murino parental en un rango de relaciones de células efectoras:diana con la concentración de anticuerpo de prueba constante a 1 ug/ml. En ambos ensayos, las placas de microtitulación se incubaron 37°C durante 4 horas, se recogieron 50 ul de sobrenadante e cada pocillo y se determinó el ⁵¹Cr liberado por recuento gamma (Contador automatizado Gamma Cobra II, Canberra Packard, Melbourne, Australia). Los controles incluidos en los ensayos corregían la liberación espontánea (solo medio) y liberación total (10% Tween 20/PBS). Los controles adecuados con el mismo anticuerpo de subclase se llevaron a cabo en paralelo.

65

[0407] El porcentaje de lisis celular (citotoxicidad) se calculó según la fórmula:

$$\text{Porcentaje de citotoxicidad} = \frac{\text{Recuento de muestra} - \text{Liberación espontánea}}{\text{Liberación total} - \text{Liberación espontánea}} \times 100$$

El porcentaje (%) de citotoxicidad se representó gráficamente frente a la concentración de anticuerpo (ug/ml).

10 Resultados

[0408] Los resultados de los análisis de CDC se presentan en la Figura 37. La actividad de CDC mínima se observó en presencia de hasta 10 ug/ml ch806 con CDC comparable a la observada con control de isotipo cG250.

15 [0409] La ADCC mediada por ch806 en células U87MG.de2-7 y células A431 diana en la relación E:T de 50:1 se presenta en la figura 38. Se mostró citotoxicidad eficaz específica de ch806 contra las células U87MG.de2-7 diana, pero la ADCC mínima fue mediada por ch806 sobre las células A431. Los niveles de citotoxicidad alcanzada reflejan el número de sitios de unión de ch806 sobre las dos poblaciones celulares. Las células U87MG.de2-7 diana expresan ~ 1 X 10⁶ de2-7EGFR que son reconocidos específicamente por ch806, mientras que sólo un subconjunto de las 1 x 10⁶ moléculas de EGFR de tipo salvaje expresadas en células A431 son reconocidas por ch806 (véanse los ejemplos anteriores).

20 [0410] Además se realizaon análisis ADCC para comparar la ADCC mediada por 1 ug/ml de ch806 en células U87MG.de2-7 diana con la efectuada por 1 ug/ml mAb806 parental murino. Los resultados se presentan en la figura 39. La quimerización de mAb806 ha efectuado una mejora destacada de la ADCC lograda por el mAb murino parental con más del 30% de citotoxicidad efectuada en relaciones E:T 25: 1 y 50: 1.

25 [0411] La falta de función efectora inmune de mAb806 murino parental se ha mejorado notablemente tras la quimerización. ch806 media la ADCC buena, pero la actividad CDC mínima.

30 Ejemplo 20

Generación de anticuerpos anti-idiotipo para anticuerpo quimérico ch806

35 [0412] Para ayudar a la evaluación clínica de mAb806 o ch806, se requieren ensayos de laboratorio para controlar la farmacocinética sérica de los anticuerpos y cuantificar cualquier respuesta inmunitaria al anticuerpo quimérico de ratón-humano. Se generaron anticuerpos monoclonales anti-idiotipo (anti-IDS) de ratón y se caracterizaron para determinar su idoneidad como reactivos de ELISA para medir ch806 en muestras de suero del paciente y utilizar como controles positivos en el análisis de respuesta inmune de anticuerpo anti-quimérico humano. Estos anticuerpos anti-idiotipo también pueden ser útiles como vacunas terapéuticas o profilácticas, generando una respuesta de anticuerpos anti-EGFR natural en los pacientes.

40 [0413] Los métodos para generar anticuerpos anti-idiotipo son bien conocidos en la técnica (Chatterjee et al., 2001; Uemura et al., 1994; Steffens et al., 1997; Safa y Foon, 2001; Brown y Ling, 1988).

45 [0414] Brevemente, los anticuerpos monoclonales anti-idiotipo (anti-IDS) de ratón se generaron de la siguiente manera. Se fusionaron esplenocitos de ratones inmunizados con ch806 con células de plasmacitoma SP2/0-AG 14 y se seleccionaron los hibridomas productores de anticuerpos a través de ELISA para la unión específica a ch806 y la unión competitiva para el antígeno (figura 40). Se seleccionaron inicialmente veinticinco hibridomas y cuatro, designados LMH-11, -12, -13, y 14, secretaron anticuerpos que demostraron unión específica a ch806, mAb806 y fueron capaces de neutralizar la actividad de unión al antígeno de ch806 o mAb806 (Figura 41). El reconocimiento del idiotipo o región CDR de ch806/mAb806 se demostró por la falta de reactividad cruzada con IgG policlonal purificada humana.

50 [0415] En ausencia de antígeno EGFR de2-7 recombinante fácilmente disponible para ayudar en la determinación de ch806 en muestras de suero, se explotó la capacidad de los anticuerpos ch806 anti-idiotipo nuevos para unirse concurrentemente a regiones variables de 806 en el desarrollo de un ELISA específico sensible para medir ch806 en muestras clínicas (Figura 42). Usando LMH-12 para la captura y LMH-12 biotinilado para la detección, el ELISA validado mostró curvas de unión altamente reproducibles para medir ch806 (2 ug/ml - 1,6 ng/ml) en sueros con un límite de detección de 3 ng/ml. (n = 12; 1-100 ng/ml, Coeficiente de Variación <25%; 100 ng/ml-5 ug/ml, Coeficiente de Variación <15%). La unión de base no era evidente con los tres sueros de donantes sanos probados y se observó una unión insignificante con hu3S193 de control de isotipo. El hibridoma produce altos niveles de anticuerpo LMH-12, y está prevista la producción a mayor escala para permitir la medición de ch806 y cuantificación de cualquier respuesta inmune en muestras clínicas (Brown y Ling, 1988).

55 Resultados

[0416] Inmunización de ratones selección de clones de hibridoma. La inmunoreactividad de muestras de suero pre- y post-inmunización indica el desarrollo de mA b anti-ch806 y anti-hulgG de ratón con alta titulación. Se seleccionaron inicialmente veinticinco hibridomas que producen anticuerpos que se unían a ch806, pero no a hulG. Las características de unión de algunos de estos hibridomas se muestran en las figuras 42A y 42B. Cuatro de estos hibridomas anti-ch806 con unión de alta afinidad (clones 3E3, SB8, 9D6 y 4D8) se controlaron posteriormente para la expansión clonal de células individuales mediante dilución limitante y se designaron hibridoma (LMH) -11, -12, -13, y 14, respectivamente (Figura 42) del Ludwig Institute for Cancer Research Melbourne.

10 Actividades de unión y bloqueo de anticuerpos anti-idiotipo seleccionados

[0417] La capacidad de los anticuerpos anti-ch806 para unir simultáneamente dos anticuerpos ch806 es una característica deseable para su uso como reactivos en un ELISA para determinar los niveles de ch806 en suero. Los hibridomas clonales, LMH-11, -12, -13, y-14 mostraron una unión simultánea (datos no mostrados).

[0418] Después de la expansión clonal, los sobrenadantes de cultivo de hibridoma se examinaron por ELISA para la capacidad de neutralizar la actividad de unión a antígeno de ch806 o mA b806 con sEGFR621. Los resultados demostraron la actividad antagonista de mA b anti-idiotipo LMH-11, -12, -13, y 14 con el bloqueo en solución de la unión de ch806 y mA b806 murino a placas recubiertas con sEGFR (Figura 41 para LMH-11, -12, -13).

[0419] Después del cultivo a mayor escala en frascos rotatorios, se verificó la especificidad de unión de los hibridomas clónicos establecidos, LMH-11, -12, -13, y 14 mediante ELISA. Se identificaron los anticuerpos LMH-11 a -14 como isotipo IgG1k por el kit que isotipa el anticuerpo monoclonal de ratón.

25 ch806 en el desarrollo de ensayos ELISA de la farmacocinética de muestras clínicas de suero

[0420] Para ayudar a la determinación de ch806 en muestras de suero, se explotó la capacidad de los anticuerpos ch806 anti-idiotipo para unirse simultáneamente a la región variable de 806 en el desarrollo de un ensayo ELISA sensible y específico para ch806 en muestras clínicas. Los tres clones purificados LMH-11, -12, y 13 (Figuras 49B y 49C, respectivamente) se compararon por su capacidad para capturar y a continuación detectar el ch806 unido en el suero. Los resultados indicaron que utilizando LMH-12 (10 ug/ml) para la captura y LMH-12 biotinilado para la detección se produjo una mayor sensibilidad para ch806 en suero (3 ng/ml) con una unión de base insignificante.

[0421] Habiendo establecido las condiciones farmacocinéticas óptimas de ELISA utilizando 1 ug/ml de LMH-12 anti-idiotipo y 1 ug/ml de LMH-12 biotinilado para la captura y detección, respectivamente, se realizó la validación del método. Se realizaron tres ELISA separados por cuadruplicado para medir ch806 en suero de donante de tres donantes sanos o BSA al 1%/medio con hu3S193 de control de isotipo. Los resultados de la validación se presentan en la figura 43 y se muestran curvas de unión altamente reproducibles para medir ch806 (2 ug/ml - 1,6 ng/ml) en sueros con un límite de detección de 3 ng/ml. (n = 12; 1-100 ng/ml, Coeficiente de Variación <25%; 100 ng/ml-5 ug/ml, Coeficiente de Variación <15%). La unión de base no era evidente con cualquiera de los tres sueros probado y se observó una unión insignificante con hu3S193 de control de isotipo.

Ejemplo 21

45 Evaluación de las estructuras de carbohidratos y el reconocimiento de anticuerpos

[0422] Se llevaron a cabo experimentos para evaluar más a fondo el papel de las estructuras de carbohidratos en la unión y el reconocimiento de EGFR, tanto amplificado como EGFR de2-7, por el anticuerpo mA b806.

[0423] Para determinar si las estructuras de hidratos de carbono están directamente implicadas en el epítipo de mA b806, el sEGFR recombinante expresado en células CHO se trató con PNGasa F para eliminar la N-glicosilación. Después del tratamiento, la proteína se desarrolló en SDS-PAGE, se transfirió a una membrana y se inmunotransfirió con mA b806 (Figura 44). Como era de esperar, el sEGFR desglicosilado corrió más rápido en SDS-PAGE, lo que indica que los hidratos de carbono se han eliminado con éxito. El anticuerpo mA b806 se unió claramente al material desglicosilado demostrando que el epítipo de anticuerpo es el péptido en la naturaleza y no únicamente un epítipo de glicosilación.

[0424] Los lisados, preparados a partir de líneas de células metabólicamente marcadas con ³⁵S, se inmunoprecipitaron con diferentes anticuerpos dirigidos al EGFR (Figura 45). Como se esperaba, el anticuerpo 528 inmunoprecipitó tres bandas de células U87MG.Δ2-7, una banda superior correspondiente al EGFR de tipo salvaje (wt) y dos bandas inferiores correspondientes al EGFR de2-7. Estas dos bandas de EGFR de2-7 se han descrito anteriormente, y se supone que representan la glicosilación diferencial (Chu et al (1997) Biochem J. 15 de junio; 324 (Pt 3): 885-861). En cambio, mA b806 sólo inmunoprecipitó las dos bandas de EGFR de2-7, estando el receptor de tipo salvaje completamente ausente incluso después de la sobreexposición (datos no mostrados). Curiosamente, mA b806 mostró un aumento de la reactividad relativa con la banda inferior EGFR de2-7 pero disminuyó la reactividad con la banda superior en comparación con el anticuerpo 528. El anticuerpo SC-03, un anticuerpo

policlonal de conejo comercial dirigido al dominio C-terminal del EGFR, inmunoprecipitó las tres bandas de EGFR tal como se ha observado con el anticuerpo 528, aunque la cantidad total de receptor inmunoprecipitado por este anticuerpo fue considerablemente menor. No se observaron bandas cuando se utilizó un anticuerpo IgG2b irrelevante como control para mAb806 (véase el Ejemplo 18).

[0425] El anticuerpo 528 inmunoprecipitó una sola banda a partir de células U87MG.wtEGFR correspondiente al receptor de tipo salvaje (Figura 45). mAb806 también inmunoprecipitó una sola banda a partir de estas células, sin embargo, esta banda de EGFR migró claramente más rápido que el receptor reactivo de 528. El anticuerpo SC-03 inmunoprecipitó ambas bandas reactivas de EGFR a partir de células U87MG.wtEGFR, confirmando además que mAb806 y 528 reconocen diferentes formas de la EGFR en lisados de células enteras de estas células.

[0426] Según se observó con células U87MG.wtEGFR, el anticuerpo 528 inmunoprecipitó una sola banda de EGFR a partir de células A431 (Figura 45). La banda de EGFR reactiva a 528 es muy amplia en estos geles a bajo porcentaje (6%) y probablemente refleja la diversidad de glicosilación de los receptores. También se observó una sola banda de EGFR después de la inmunoprecipitación con mAb806. Si bien esta banda de EGFR no migró considerablemente más rápido que la banda ancha global reactiva a 528, se localizó en el extremo conductor de la banda ancha de 528 de una manera reproducible. A diferencia de los lisados celulares de U87MG.Δ2-7, la cantidad total de EGFR inmunoprecipitado por mAb806 a partir de lisados de A431 fue considerablemente menor que con el anticuerpo 528, un resultado consistente con nuestros datos de Scatchard que muestran que mAb806 sólo reconoce una parte del EGFR en la superficie de estas células (véase el Ejemplo 4). La inmunoprecipitación con SC-03 dio como resultado una única banda amplia de EGFR como para el anticuerpo 528. Se obtuvieron resultados similares con células HN5 (datos no mostrados). Tomados en conjunto, estos datos indican que mAb806 reacciona preferentemente con especies que migran más rápido del EGFR, lo cual puede representar formas diferencialmente glicosiladas del receptor.

[0427] Con el fin de determinar en qué etapa del procesamiento del receptor aparecía la reactividad de mAb806 se llevó a cabo un experimento de pulso/seguimiento. Las células A431 y U87MG.Δ2-7 se pulsaron durante 5 min con ³⁵S metionina/cisteína, a continuación, se incubaron a 37°C durante diversos tiempos antes de la inmunoprecipitación con mAb806 o 528 (Figura 46). El patrón de inmunoprecipitación en células A431 con el anticuerpo 528 fue el típico de un anticuerpo dependiente conformacional específico para el EGFR. Una pequeña cantidad de receptor se inmunoprecipitó a 0 min (es decir, después de 5 min de pulsos) aumentando la cantidad de EGFR marcado en cada punto de tiempo. También hubo un aumento simultáneo en el peso molecular del receptor con el tiempo. En cambio, el material de EGFR reactivo a mAb806 estaba presente en niveles altos en 0 min, alcanzó su punto máximo a los 20 min y después se redujo en cada punto de tiempo adicional. Por lo tanto, parece que mAb806 reconoce preferentemente una forma del EGFR encontrado en una etapa temprana del procesamiento.

[0428] La reactividad de anticuerpos observada en las células U87MG.Δ2-7 marcadas con pulsos era más complicada. La inmunoprecipitación con el anticuerpo 528 a 0 min reveló que una pequeña cantidad de la banda inferior de EGFR de2-7 estaba marcada (Figura 46). La cantidad de la banda inferior de EGFR de2-7 reactiva a 528 aumentó con el tiempo, alcanzando un máximo a los 60 minutos y disminuyendo lentamente a las 2 y 4 h. No se detectó ninguna cantidad significativa de la banda superior marcada de EGFR de2-7 hasta 60 min, después de lo cual el nivel continuó aumentando hasta el final del transcurso del tiempo. Esto indica claramente que el EGFR de2-7 superior es una forma más madura del receptor. La reactividad con mAb806 también varió durante el tiempo de estudio, sin embargo mAb806 preferentemente precipitó la banda inferior del EGFR de27. De hecho, no se observaron niveles significativos de banda superior de mAb806 visto hasta 4 h después del marcaje.

[0429] Los experimentos anteriores sugieren que mAb806 reacciona preferentemente con una forma de glicosilación más inmadura de de2-7 y wtEGFR. Esta posibilidad se probó mediante la inmunoprecipitación de EGFR a partir de diferentes líneas de células marcadas durante la noche con ³⁵S metionina/cisteína y sometiendo a continuación los precipitados resultantes a digestión con endoglicosidasa H (Endo H). Esta enzima elimina preferentemente carbohidratos del tipo altos en manosa (es decir, de glicosilación inmadura) de proteínas, dejando los carbohidratos complejos (es decir, de glicosilación madura) intactos. La inmunoprecipitación y la digestión con Endo H de lisados celulares U87MG.Δ2.7 marcados con 528, mAb806 y SC-03 dieron resultados similares (Figura 47).

[0430] Como se predijo, la banda inferior de EGFR de2-7 era totalmente sensible a la digestión con Endo H, migrando más rápidamente en SDS-PAGE después de la digestión con Endo H, lo que demuestra que esta banda representa la forma alta en manosa de EGFR de2-7. La banda superior de EGFR de2-7 era esencialmente resistente a la digestión con Endo H, mostrando sólo una muy ligera diferencia en la migración después de la digestión con Endo H, lo que indica que la mayoría de las estructuras de carbohidratos son del tipo complejo. La disminución pequeña pero reproducible en el peso molecular de la banda superior después de la digestión con la enzima sugiere que mientras que los hidratos de carbono en la banda superior de EGFR de2-7 son predominantemente del tipo complejo, poseen algunas estructuras altas en manosa. Curiosamente, estas células también expresan cantidades bajas de wtEGFR endógeno que es claramente visible después de la inmunoprecipitación con 528. Había también una pequeña pero notable reducción en el peso molecular del receptor de tipo salvaje después de digestión con Endo H, indicando que también contiene estructuras altas en manosa.

[0431] La sensibilidad del wtEGFR inmunoprecipitado a la digestión con Endo H fue similar en células U87MG.wtEGFR y A431 (Figura 47). La mayor parte del material precipitado por el anticuerpo 528 fue resistente a la enzima Endo H, aunque una pequeña cantidad del material era de la forma alta en manosa. Una vez más, había una pequeña disminución en el peso molecular del wtEGFR después de la digestión con Endo H, lo que sugiere que sí contiene algunas estructuras altas en manosa. Los resultados utilizando el anticuerpo SC-03 fueron similares al anticuerpo 528. En cambio, la mayoría del EGFR precipitada por mAb806 era sensible a Endo H en células U87MG.wtEGFR y A431, confirmando que mAb806 reconoce preferentemente la forma alta en manosa del EGFR. Se obtuvieron resultados similares con células HN-5, en el que la mayoría del material precipitado por mAb806 era sensible a la digestión con Endo H, mientras que la mayoría del material precipitado por mAb528 y SC-03 era resistente a la digestión con Endo H (datos no mostrados).

[0432] La yodación de la superficie celular de la línea celular A431 se realizó con ¹²⁵I seguido por inmunoprecipitación con el anticuerpo 806. El protocolo de yodación de la superficie el siguiente: lisis celular, inmunoprecipitación, digestión con Endo H, SDS PAGE y autorradiografía como se describieron anteriormente en el presente documento. Para el marcaje, las células se hicieron crecer en medios con 10% de FCS, se separaron con EDTA, se lavaron dos veces con PBS y a continuación se resuspendieron en 400 ul de PBS (aproximadamente 2-3 x 10⁶ células). A esto se añadieron 15 ul de ¹²⁵I (100 mCi/ml), 100 ul de solución madre de lactoperoxidasa bovina (1 mg/ml), 10 ul H₂O₂ (solución madre al 0,1%) y esto se incubó durante 5 minutos. A continuación, se añadieron otros 10 ul de H₂O₂ y la incubación continuó durante otros 3 min. Las células fueron lavadas de nuevo 3 veces con PBS y se lisaron en 1% de Triton. La yodación de la superficie celular de la línea celular A431 con lactoperoxidasa, seguido por inmunoprecipitación con el anticuerpo 806, mostró que, de forma similar a los extractos celulares totales descritos anteriormente, la forma predominante del EGFR reconocida por 806 unido en la superficie celular de las células A431 era sensible a la digestión con EndoH (Figura 48). Esto confirma que la forma de EGFR unida por 806 en la superficie celular de las células A431 es una forma sensible a EndoH y por lo tanto es del tipo de alta en manosa.

Ejemplo 22

Anticuerpo 806 humanizado (remodelado)

A. Construcción de hu806

[0433] Se construyó un vector de expresión para un anticuerpo humanizado 806 (hu806). El vector, denominado 8C65AAG (11891 pb; SEQ ID NO: 41), fue diseñado para contener ambos genes para un hu806 de longitud completa en un solo casete de expresión génica impulsado por el promotor GS (Figuras 53 y 54).

[0434] Las regiones variables de cadena pesada (VH) y constantes (CH) (SEQ ID NOS: 42 y 43, respectivamente) se muestran en la Figura 55A, con la región VH CDR1, CDR2, y CDR3 (SEQ ID NOS: 44, 45, y 46, respectivamente) indicada mediante subrayado.

[0435] Las regiones variables de cadena ligera (VL) y constantes (CL) (SEQ ID NOS: 47 y 48, respectivamente) se muestran en la Figura 55B, con la región VL CDR1, CDR2, y CDR3 (SEQ ID NOS: 49, 50, y 51, respectivamente) indicada mediante subrayado.

[0436] Para obtener un constructo de anticuerpo 806 humanizado, se utilizó la tecnología de remodelación ("veneering") (v) (Daugherty et al. (1991) Polymerase chain reaction facilitates the cloning, CDR-grafting, and rapid expression of a murine monoclonal antibody directed against the CD18 component of leukocyte integrins. Nucleic Acids Res 19 (9), 2471-6; patente de Estados Unidos 6.797.492 de Daugherty; Padlan, EA (1991) A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties. Mol. Immunol 28 (4-5) 489-98; patente europea No. 519596 de Padlan et al. Con el fin de minimizar la inmunogenicidad de dominios variables de anticuerpo 806, a la vez que se conservan las propiedades de unión a ligandos, se llevó a cabo el reemplazo de los residuos expuestos en la superficie en las regiones armazón que difieren de los que normalmente se encuentran en los anticuerpos humanos. Para lograr esto, se han rediseñado la cadena VL y VH del anticuerpo monoclonal de ratón (mAb) 806 mediante síntesis génica y tecnología de cebadores de PCR superpuestos. La cadena CL (kappa) se ensambló de la misma manera. Para demostrar la conservación de los sitios de unión intactos, también se expresaron vVL y vVH en un formato de scFv que mostró una buena unión al péptido sintético que comprende el epítipo antigénico de 806 mediante ELISA y al dominio extracelular (ECD) del EGF receptor recombinante (EGFR), tal como se mide por análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR).

[0437] El v806VL y v806VH han sido diseñados en un contexto de IgG1 humana de longitud completa utilizando una LC kappa optimizada en codones y una región constante de cadena pesada de IgG1 humana optimizada con codón y sitio de empalme recién diseñados para alcanzar una expresión génica estable en sistemas celulares NS0 y CHO. El sistema de expresión se basa en el sistema de expresión LONZA GS utilizando los vectores de expresión de cadena pesada y ligera pEE12.4 y pEE6.4 proporcionados por Lonza Biologics.

[0438] El producto de anticuerpo hu806 (Figura 55) obtenido por la expresión transitoria del vector 8C65AAG era reactivo con EGFR-ECD recombinante por SPR, y con el epítipo de péptido sintético EGFR 806 por ELISA. El vector 8C65AAG se transfirió a LICR Afiliado Christoph Renner (Universidad de Zurich) para la generación de líneas celulares estables hu806 GS-NS0 y a LICR, Melbourne Centre, para la generación de líneas celulares hu806 GS-CHO.

Estrategia para la construcción, lamplificación y clonación de genes de anticuerpos hu806

Remodelación y optimización de codones

[0439] La remodelación de anticuerpos es una estrategia de humanización dirigida a contrarrestar las respuestas de HAMA (anticuerpo anti-ratón humano). Los mAbs de ratón se consideran antígenos "exogenos" por el sistema inmunológico del paciente y se induce una respuesta inmune, incluso tras una sola administración, evitando el uso adicional del reactivo en esos pacientes. En el primer paso del proceso de remodelación de mAb806, se analizaron las secuencias de aminoácidos de las cadenas VL y VH en mAb806, y se clasificó cada residuo de aminoácido en la secuencia de la proteína mAb806 por la exposición a la superficie (figura 56 y figura 57). Sólo aquellos aminoácidos que estaban en el exterior de la molécula de anticuerpo fueron considerados para posible modificación, ya que éstos eran los únicos que estarían expuestos al reconocimiento del anticuerpo. Usando BLAST, la secuencia de la proteína mAb806 se comparó con tres secuencias de anticuerpos humanos (VH36germ, CAD26810, y AAA37941). Siempre que un residuo de la superficie mAb806 no coincidía con el consenso de las secuencias de anticuerpos humanos, ese residuo se identificaba para ser cambiado a la secuencia de consenso. Inicialmente 12 aminoácidos en la VL se sometieron a remodelación; y 14 en la cadena VH de ch806 (Figura 56 y figura 57).

[0440] La optimización de codones es un medio para mejorar la expresión heteróloga de anticuerpos u otras proteínas basado en la preferencia de codones del sistema utilizado para expresar estos anticuerpos. Uno de los objetivos de la creación de hu806 era utilizar la optimización de codones para mejorar los niveles de expresión de este anticuerpo. El sistema de expresión se basa en el sistema de expresión LONZA GS que utiliza los vectores de expresión HC y LC de pEE6.4 y pEE12.4 proporcionados por LONZA Biologics y células NS0 y/o CHO como células de producción. Por lo tanto, las decisiones acerca de qué codón usar para un determinado aminoácido se tomaron con la consideración de si ese codón sería favorecido o no en los sistemas de expresión NS0/CHO.

Construcción y amplificación de secuencias de ADN de 806 por PCR

[0441] Las secuencias para versiones remodeladas optimizadas de codón de las regiones variable pesada (VH) y variable ligera (VL) del anticuerpo hu806 se sintetizaron de la siguiente manera: Para cada región (VH o VL), se diseñaron 8-10 oligonucleótidos como cebadores sentido y antisentido solapantes. Estos oligos se solaparían entre sí de tal manera como para cubrir toda la secuencia de VH o VL de hu806, incluyendo la secuencia señal, secuencias codificantes, intrones, y incluyen un sitio HindIII en el extremo 5' y un sitio 3' BamHI en el extremo 3'. Los mapas de oligonucleótidos se presentan en las figuras 56B y 57B, y los detalles de cebadores se proporcionan a continuación.

[0442] Brevemente, la VH o VL de hu806 se ensambló por PCR de la siguiente manera: Inicialmente los oligos 1, 2, 3, 4, los oligos 5, 6 y los oligos 7, 8, 9, 10 de v806hc o v806lc se combinaron en tres reacciones separadas. Se añadieron alícuotas (50 pmol) de cada oligo de flaqueo, y 5 pmol de cada oligo interno a una reacción de PCR de 50 ul que contenía 25 ul de 2x HotStar Taq Master Mix (Qiagen) y 48 ul de agua libre de nucleasa. El programa de ciclado térmico fue de la siguiente manera: 95°C; 15", [94°C; 30", 58°C; 30", 72°C; 30"] X 20 ciclos, 72°C; 10", 4°C. Los productos de estas tres reacciones se separaron después de la separación por electroforesis en gel. A continuación se purificaron usando una columna de sal (Qiagen-Qiaspin Minipreps), y se combinaron. Estos productos fueron amplificados adicionalmente por PCR usando los cebadores 1 y 10. El producto de esta segunda reacción incluía sitios de enzimas de restricción para HindIII y BamHI, lo que permite la inserción en plásmidos de expresión.

Oligonucleótidos utilizados para la síntesis por PCR las regiones V de hu806:

[0443]

(véase el cuadro) [Tabla sin formato sigue]

- v806 VH:

- v806hc -1: GAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTGGACCTGGCGCATTC

SEQ ID NO:

52

5	v806hc -2:	CCCTTCCTCCTCACTGGGATTTGGCAGCCCCTTACCTGTGGCGGCTGCT ACCAGAAAGAGAATGCGCCAGGTCCAATCC	53
	v806hc -3:	CCCAGTGAGGAGGAAGGGATCGAAGGTCACCATCGAAGCCAGTCAAG GGGGCTTCCATCCACTCCTGTGTCTTCTCTAC	54
10	v806hc-4:	GACTCGGCTTGACAAGCCCAGGTCCACTCTCTTGGAGCTGCACCTGGCT GTGGACACCTGTAGAGAAGACACAGGAGTGG	55
	v806hc -5:	GGGCTTGTC AAGCCGAGTCAAAC TTTGTCCCTAACATGTACTGTGTCCG GATACTCTATCTCATCAGATTTTGGCGTGGAAATTGG	56
15	v806hc -6:	CCCAGAGTATGATATGTAGCCCATCCATTCTAAACCTTTCCTGGTGGC TGCCTTATCCAATTCCACGCAAAAATCTGATG	57
	v806hc -7:	GGGCTACATATCATACTCTGGGAACACCAGATATCAACCCTCTCTGAA AAGCCGGATCACAATCACTAGGGACACGTCG	58
20	v806hc -8:	GCAGTAATATGTTGCTGTGTCTGGGGCTGTAACGGAGTTCAGCTGCAG GAAGAACTGGCTCTTCGACGTGTCCCTAGTGATTG	59
	v806hc-9:	CCAGACACAGCAACATATTACTGCGTAACCGCTGGCAGAGGCTTCCCC TATTGGGGACAGGGCACCTAGTGACAGTGAGC	60
25	v806hc -10:	CACGGATCCATCTTACCGCTGCTCACTGTCACTAGGGTG	61
	v806 VL:		SEQ ID
	v806lc -1:	GAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTG	62
30	v806lc 2:	CTGGGATTTGGCAGCCCCTTACCTGTTGCGGCTGCTACAAGAAACAGTA TTCTCCAAGTCCAATCCATGGTGGCGGCAAG	63
	v806lc 3:	GGGGCTGCCAAATCCCAGTGAGGAGGAAGGGATCGAAGGTGACCATC GAAGCCAGTCAAGGGGGCTTCCATCCACTCC	64
35	v806lc 4:	CATGCTGGATGGACTCTGAGTCATCTGAATATCACTGTGAACACCTGTA GAGAAGACACAGGAGTGGATGGAAGCCC	65
	v806lc 5:	CTCAGAGTCCATCCAGCATGTCAGTCTCCGTGGGAGATAGGGTGACGA TAACCTGTCATTCAAGCCAAGACATCAACTCC	66
40	v806lc 6:	GTTCCGTGATAGATTAGTCCTTTGAAGGACTTACCAGGCTTCTGTTGGA GCCATCCAATATTGGAGTTGATGTCTTGGCTTG	67
	v806lc 7:	CAAAGGACTAATCTATCACGGAACAACTTGGACGACGGCGTGCCATC GAGATTTTCAGGGTCTGGCAGCGGGACCGACTATAC	68
45	v806lc 8:	GTGCTGGACGCAGTAGTATGTGGCAAAGTCTTCTGGCTCTAAGCTAGA GATGGTCAGTGTATAGTCGGTCCCCGCTG	69
	v806lc -9:	CATACTACTGCGTCCAGCACGCTCAGTTCCTCCCTGGACATTCGGCGGCGG CACAAAAC TGGAAATCAAACGTGAGTAGGG	70
50	v806lc 10:	CTCGGATCCCTACTCACGTTTGATTTC	71

CL de hu806:

55 **[0444]** Se preparó la versión de la cadena ligera kappa constante (CL) optimizada de codón de una manera similar a la utilizada para las regiones variables. Sin embargo, la etapa inicial de PCR implicó la creación de sólo dos productos preliminares utilizando oligos VKIcons- 1, 2, 3, 4; y 5, 6, 7, 8. Además, los sitios de restricción de flanqueo para este producto fueron BamHI y NotI antes de la inserción de plásmido.

60 Oligonucleótidos utilizados para la síntesis por PCR de regiones CL de hu806:

[0445]

65

			SEQ ID NO: 72
	- VK1 cons-1:	GACGGATCCTTCTAAACTCTGAGGGGGTCCGATGACG	
5	VK1cons-2:	GGAGCTGCGACGGTTCCTGAGGAAAGAAGCAAACAGGATGGTGTTTAA GTAACAATGGCCACGTCATCCGACCCCCTC	73
	VK1 cons-3:	GGAACCGTCGCAGCTCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCCCATCCGACGAGC AACTGAAGTCAGGCACAGCCTCCGTGGTG	74
10	VK1cons-4:	GTGCGTTGTCCACTTTCCTGACTTTGGCCTCTCTTGGGTAAAAGTT ATTAAGGAGGCACACCACGGAGGCTGTGC	75
	VK1 cons-5:	GTGGAAAGTGGACAACGCACTACAGAGCGGAACTCTCAGGAAAGCG TGACAGAGCAGGACTCAAAGATTCAACATACAGCC	76
15	VK1 cons-6:	CTTCACAGGCATATACCTTGTGCTTTTCATAATCAGCTTTTGACAGTGTC AGGGTAGAAGATAGGCTGTATGTTGAATCTTTTGAGTC	77
	VK1 cons-7:	GCACAAGGTATATGCCTGTGAAGTAACTCATCAGGGACTCAGCAGCCC TGCTACTAAAAGTTTAAATAGAG	78
20	VK1 cons-8:	CCTGCGGCCGCTTATCAGCATTCGCCTCTATTAATAACTTTTGGTGAGAG GG	79

CH de hu806:

25 **[0446]** Se adquirió una versión humanizada sintética del gen de cadena pesada (CH) constante de IgG1 (SEQ ID NO: 80) de GeneArt, Regensburg, Alemania. El gen se optimizó de codón para la expresión en células CHO/NS0. Los detalles de la secuencia del gen, sitios de restricción, etc., se muestran en la Figura 58.

Construcción de plásmidos de expresión

30 **[0447]** Para la transfección transitoria y las pruebas preliminares, se unieron las secuencias de VH y VL de hu806 preparadas en la forma descrita anteriormente en vectores de expresión que contienen regiones constantes genéricas. Estos vectores, proporcionados por LICR Affiliate Christoph Renner (Universidad de Zurich, Suiza), eran conocidos como pEAK8 HC (que contenía una CH genérica) y a33-xm-lc (que contenía una CL genérico). Se digirieron vectores usando BamHI y HindIII en presencia de CIP, a continuación se unieron VH y VL de hu806 en los
35 vectores correspondientes. Los plásmidos resultantes se utilizaron para transformar E. coli químicamente competente Top10 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las E. coli transformadas se sembraron en placas de LB + ampicilina, y los clones resistentes se seleccionaron por digestión de restricción y PCR. En general, ocho clones positivos detectados de esta manera se aíslan y se amplifican adicionalmente. El ADN purificado a partir de estas colonias se analizó mediante secuenciación de ADN automatizada.

40 **[0448]** Se añadieron versiones de las regiones constantes optimizadas de codón a estos constructos mediante digestión con enzima de restricción y unión utilizando BamHI y NotI. Estos transformantes fueron seleccionados, secuenciados, y analizados tal como se ha indicado anteriormente. Antes de unir las cadenas de anticuerpo de longitud completa en el sistema de Lonza GS, se destruyó el sitio BamHI entre las secuencias de región variable y constante, en un caso, mediante digestión utilizando BamHI, relleno utilizando ADN polimerasa, y unión a extremo
45 romo.

50 **[0449]** Los fragmentos de restricción que contienen hu806 (VH + CH) o hu806 (VL + CL) se digirieron con NotI seguido por HindIII. Estas digestiones fueron diseñadas para crear un extremo romo en el sitio NotI, y por lo tanto se realizaron en serie de la siguiente manera: el plásmido se digirió primero con NotI. El plásmido totalmente digerido (de un solo corte) se separó mediante electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1%. Este producto se escindió y se purificó en una columna de sal y se llenó utilizando ADN polimerasa. El producto de esta reacción se purificó por columna de sal y se digirió a continuación con HindIII. A continuación, este producto (~ 1,3 kb para hu806 (VH + CH), y ~ 0,8 Kb para hu806 (VL + CL)) se separó por electroforesis en gel, se escindió y se purificó.

55 **[0450]** Los vectores pEE12.4 y pEE6.4 (Lonza Biologics plc, Slough, Reino Unido) se digirieron cada uno en HindIII y PmlI. hu806 (VH + CH) se ligó a pEE12.4 para crear pEE12.4-hu806H y hu806 (VL + CL) se ligó a pEE6.4 para crear pEE6.4-hu806L.

60 **[0451]** Después del cribado, se creó un plásmido de doble gen Lonza para contener las secuencias de cadena pesada y ligera de hu806. Brevemente, se digirieron los vectores pEE12.4-hu806H y pEE6.4-hu806L con enzimas de restricción NotI y Sall. Los fragmentos resultantes, que contenían la unidad de transcripción GS y el promotor hCMV-MIE, seguido por el casete de expresión de cadena pesada o ligera de hu806, se aislaron y se ligaron juntos.
65 El plásmido Lonza "combinado" resultante (denominado 8C65AAG) se utilizó para las transfecciones transitorias de

un solo plásmido en un sistema de células HEK 293 y transfecciones estables en los sistemas de NS0 y CHO. Un mapa del plásmido se muestra en la Figura 53.

Modificaciones a constructos

5 **[0452]** Las secuencias de aminoácidos verificadas de secuencia completa de hu806 Hc y hu806 Lc remodeladas se muestran en comparación con mAb806 en las figuras 59 y 60, respectivamente. El flaqueo de la secuencia hu806 dentro de los apéndices son asteriscos (*) que indican cambios de remodelación iniciales y los números (1-8) se refieren a las modificaciones numeradas 1 a 8 descritas en este documento.

10 **[0453]** Con respecto a la Figura 60, el archivo de referencia (mAb806 LC) indica incorrectamente la histidina (H), no la tirosina correcta (Y) en la posición 91; el objetivo de la modificación nº 1. La secuencia de archivos sin corregir original se incluye en la Figura 60 para ilustrar la modificación necesaria realizada a hu806 en la posición 91.

15 **[0454]** Se realizaron una serie de modificaciones a las secuencias de ADNc de hu806 después de la fase inicial de construcción y secuenciación. Las razones para hacer estas modificaciones incluyen: introducción de 4 sitios de enzimas de restricción para fines de modificación de la secuencia, corregir 2 errores de aminoácidos en la secuencia introducida durante la PCR, corregir un error de aminoácido derivado de la documentación de mAb806 inicial, y diseñar 4 cambios adicionales de aminoácidos para efectuar variantes de remodelación adicionales. Se realizaron las siguientes 8 etapas de modificaciones:

1. VL de hu806 VL: CDR3 H91Y

25 **[0455]** El documento del cual se crearon los oligonucleótidos originales incorrectamente indicaba que había un CAC (histidina, H) en la posición 91 en la CDR3 de la secuencia de VL de mAb806. Se utilizó la mutagénesis dirigida de sitio para generar la secuencia correcta de TAC (Tirosina, Y; patente WO02/092771). El consiguiente cambio en la secuencia de aminoácidos en esta posición fue de CVQHAQF (SEQ ID NO: 84) a CVQYAQF (SEQ ID NO: 85). El ADN final y la secuencia de proteína traducida en comparación con ch806 se muestran en la Figura 61.

30 **[0456]** Cebador sentido para la modificación de histidina a tirosina de la región VL de hu806 (PDV 1; 40 unidades) 5'-CCACATACTACTGCGTCCAGTACGCTCAGTCCCTGGAC-3' (SEQ ID NO: 86) cebador antisentido para la modificación de histidina a tirosina de la región VL de hu806 (PDV2; 20 unidades) 5'-CTGGACGCAGTAGTATGTGG -3 '(SEQ ID NO: 87)

35 2. Cadena pesada de hu806: adición de sitios de restricción DralII y FseI

[0457] Se añadieron sitios de enzimas de restricción para los intrones que rodean las regiones VH y VL de hu806. Estos sitios de restricción (únicos en el sistema de vectores pREN, LICR) fueron diseñados para facilitar el proceso de realizar modificaciones en los casetes de expresión. La secuencia VH de hu806, sin incluir la región de señal inicial, podría eliminarse o insertarse mediante una sola digestión en DralII. Además, se podría utilizar FseI, en concordancia con NotI (sistema pREN) o EcoRI (Sistema de Lonza) para cortar la región constante, cumpliendo la función de BamHI de la secuencia original.

45 **[0458]** Estas modificaciones se consiguieron utilizando un proceso de PCR de dos etapas. Los productos fueron digeridos a continuación con HindIII y BglII. Se ligaron a continuación en vectores de pREN que contienen regiones constantes optimizadas de codones, que habían sido digeridas en HindIII y BamHI. Este proceso de re-ligación destruyó el sitio BamHI.

cebador sentido para la región variable en dirección 5' del primer sitio DralII (cadena pesada de 806 DralII arriba; 26 unidades)

50 5'-GAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTG -3 '(SEQ ID NO: 88)

cebador antisentido que incorpora el sitio I DralII I (cadena pesada de 806 DralII abajo; 28 unidades)

5'CACTGGGTGACTGGCTTCGATGGTGACC 3 '(SEQ ID NO: 89)

cebador sentido para la región variable HC entre los dos sitios DralII (cadena pesada de 806 DralII-FseI arriba; 49 unidades)

55 5'GGTCAACCATCGAAGCCAGTCAACCCAGTGAAGGGGGCTTCCATCCACTCC -3 '(SEQ ID NO: 90)

[0459] Cebador antisentido que incorpora el sitio II de DralII, y el sitio FseI (cadena pesada de 806 DralII-FseI abajo; 44 unidades)

60 5'-CCAAGATCTGGCCGGCCACGGTGTGCCATCTTACCGCTGCTCAC -3 '(SEQ ID NO: 91)

3. Cadena ligera de hu806: Adición de los sitios de restricción RsrII y PacI

[0460] Para la cadena ligera de hu806, los sitios de restricción añadidos fueron RsrII, que tienen la misma función que DralII en la cadena pesada y PacI, que se correspondía con la función de FseI.

65 cebador sentido de la región variable en dirección 5' del primer sitio RsrII (cadena ligera de 806 RsrII arriba; 22 unidades)

5'GAGAAGCTTGCCGCCACCATGG 3 '(SEQ ID NO: 92)

cebador antisentido que incorpora el sitio I de RsrII (cadena ligera de 806 RsrII abajo; 25 unidades)

5'CGGTCCGCCCCCTTGGACTGGCTTCG 3' (SEQ ID NO: 93)

5 cebador sentido para la región variable de LC entre los dos sitios de RsrII (cadena ligera de 806 RsrII-Pacl arriba; 45 unidades)

5'-CGAAGCCAGTCAAGGGGGCGGACCGCTTCCATCCACTCCTGTGTC-3' (SEQ ID NO: 94)

cebador antisentido que incorpora el sitio II de RsrII II, y el sitio Pacl (cadena ligera de 806 RsrII-Pacl abajo; 50 unidades)

5'CCAAGATCTTTAATTAACGGACCGCTACTCACGTTTGATTTCAGTTTTG 3 '(SEQ ID NO: 95)

10

4. VH de hu806 VH: remodelación de P85A

[0461] La secuencia de la proteína para el mAb806 parental en los aminoácidos de VH 81-87 es SVTIEDT (SEQ ID NO: 96). Como parte del proceso de remodelación, se cambiaron isoleucina y ácido glutámico en las posiciones 84 y 85 a alanina-prolina para leer SVTAPDT (SEQ ID NO: 97; Figura 56). Tras un análisis más detallado, se decidió que la alanina podría haber sido una mejor opción que la prolina en este caso. Se utilizó mutagénesis dirigida de sitio para generar este cambio secundario (SVTAADT, SEQ ID NO: 98) usando los cebadores listados a continuación. El ADN final y las secuencias de proteínas traducidas se presentan en la Figura 62.

15

cebador sentido (Fx3; 49 unidades)

5'-CTGCAGCTGAAGTCCGTTACAGCCGCAGACACAGCAACATATTACTGCG -3 '(SEQ ID NO: 99)

20

cebador antisentido (Fx4; 49 unidades)

5'-CGCAGTAATATGTTGCTGTGTCTGCGGCTGTAACGGAGTTCAGCTGCAG -3 '(SEQ ID NO: 100)

5. VH de hu806 VH: Remodelación adicional

25

[0462] La secuencia de la región variable de cadena pesada de hu806 se sometió a otras tres mutaciones después del remoelado inicial: T70S, S76N y Q81K. El cambio en la posición 76 de serina a asparagina representa una corrección de vuelta a la secuencia original de la molécula de mAb806. Los cambios adicionales en el armazón se incluyeron porque representan residuos que no se encuentran en los anticuerpos de ratón, pero se encuentran en los anticuerpos humanos. Por consiguiente, la secuencia de la proteína TRDTSKSQFFLQ (SEQ ID NO: 101) fue remodelada a SRDTSKNQFFLK (SEQ ID NO: 102). El ADN final y las secuencias de proteínas traducidas en comparación con mAb806 se presentan en la Figura 62.

30

cebador sentido para el fragmento 5' de PCR de la región variable de HC (hu806HCfx2-5p-U; 49 unidades)

5'-GGTACCATCGAAGCCAGTCAAGGGGGCTTCCATCCACTCC -3 '(SEQ ID NO: 103)

35

cebador antisentido para el fragmento 5' de PCR, incorpora primero dos cambios (hu806HCfx2-5p-D; 45 unidades)

5'-GATTCTTCGACGTGTCCTTGAGATTGTGATCCGGCTTTTCAGAG -3 '(SEQ ID NO: 104)

cebador sentido de fragmento 3' de PCR, incorpora todos los cambios (hu806HCfx2-3p-U; 55unidades)

5'-CAAGGGACACGTCGAAGAATCAGTTCTTCTGAACTGAACTCCGTTACAGCCGC -3' (SEQ ID NO: 105)

40

cebador antisentido para el fragmento 3' de PCR de la región variable de HC (hu806HCfx2-3p-D; 44 unidades)

5'-CCAAGATCTGGCCGGCCACGGTGTGCCATTTACCGCTGCTCAC -3 '(SEQ ID NO: 106)

6. VL de hu806: Remodelación de E79Q

[0463] Esta fue la única modificación de remodelación de VL realizada posterior a la construcción. En la posición 79 se empleó la mutagénesis dirigida de sitio para corregir la secuencia SSLEPE (SEQ ID NO: 107) a SSLQPE (SEQ ID NO: 108). El ADN final y las secuencias de proteínas traducidas en comparación con ch806 se presentan en la Figura 61.

45

Cebador sentido para el fragmento 5' de PCR de la región variable de LC (hu806LC-5p-U; 45 unidades)

5'-CGAAGCCAGTCAAGGGGGCGGACCGCTTCCATCCACTCCTGTGTC -3 '(SEQ ID NO: 109)

50

cebador antisentido para el fragmento 5' de PCR, incorpora la mutación pretendida (hu806LC-5p-D; 34 unidades)

5'-CTCTGGTTGTAAGCTAGAGATGGTCAGTGATAG -3 '(SEQ ID NO: 110)

Cebador sentido para el fragmento 3' de PCR de la región variable de LC incorpora la mutación pretendida (hu806LC-3p-U; 45 unidades)

5'-CCATCTCTAGCTTACAACCAGAGGACTTTGCCACATACTACTGCG -3 '(SEQ ID NO: 111)

55

cebador antisentido para el fragmento 3' de PCR de la región variable de LC (hu806LC-3p-D; 50 unidades)

5'-CCAAGATCTTTAATTAACGGACCGCTACTCACGTTTGATTTCAGTTTTG -3 '(SEQ ID NO: 112)

7. Cadena ligera de hu806: modificación por unión-empalme de la región constante kappa

[0464] Esta mutación puntual fue necesaria para corregir un error en el empalme de la versión optimizada de codón de la región constante kappa. Antes de este cambio, la parte de la cadena de aminoácidos que comienza con VYACEVTH (SEQ ID NO: 113) y continúa hasta el final de la molécula no se habría incluido en el anticuerpo final (Figura 60).

60

cebador sentido para fragmento 5' de PCR de región constante kappa de LC (F1; 21 unidades)

5'GGCGGCACAAAACCTGGAAATC -3' (SEQ ID NO: 114)

65

cebador antisentido para fragmento 5' de PCR de región constante kappa de LC, incorpora corrección (F2; 59

unidades)

5' - GATGAGTTACTTCACAGGCATATACTTTGTGCTTTTCATAATCAGCTTTTGACAGTGTC - 3' (SEQ ID NO: 115)
 cebador sentido para fragmento 3' de PCR de región constante kappa de LC, incorpora corrección (F3; 26 unidades)

5'-AGTATATGCCTGTGAAGTAACTCATC -3' (SEQ ID NO: 116)

5 cebador antisentido para fragmento 3' de PCR de región constante kappa de LC. (F4; 17 unidades)

5' - GCCACGATGCGTCCGGC - 3' (SEQ ID NO: 117)

8. VH de hu806 VH: N60Q

10 **[0465]** Además de los cambios de remodelación realizados al anticuerpo 806 en las etapas iniciales de construcción, se cambió la asparagina en la posición 60 en CDR2 de VH a glutamina en este momento. La N-glicosilación sigue el esquema: NXS/T, donde X es cualquier aminoácido. La secuencia de aminoácidos de la posición 60 era NPS, que sigue este esquema. Sin embargo, es poco frecuente el caso de que la prolina (como en nuestro ejemplo) o cisteína se encuentre en la posición X para la N-glicosilación. Era motivo de preocupación que la glicosilación inconsistente podría conducir a variaciones en la reactividad del anticuerpo. Por lo tanto, se eliminó la asparagina, y se sustituyó por su aminoácido más estrechamente relacionado, la glutamina, eliminando cualquier potencial glicosilación de este sitio (Figura 59 y figura 62).

20 Unión de construcción 8C65AAG del anticuerpo hu806 remodelado

25 **[0466]** Se realizó la transfección transitoria de células 293FT con el plásmido final 8C65AAG para permitir la preparación de pequeñas cantidades de hu806 para la verificación de unión al antígeno inicial. Se agruparon los sobrenadantes de cultivo de varias transfecciones transitorias de replicas a pequeña escala, se concentraron y se recogió el anticuerpo hu806 utilizando una etapa de cromatografía de proteína A. Se obtuvieron aproximadamente 1-2 ug de anticuerpo hu806 tal como se mide por un ELISA cuantitativo de hulG1 y el anticuerpo se analizó mediante Biacore por la unión a EGFR-ECD recombinante (Figura 63). La inmunoglobulina bovina del medio de cultivo celular se copurificó con hu806 y se representó la mayor fracción de IgG total, lo que limita la evaluación cuantitativa de la unión de hu806.

30 Cebadores de secuenciación

[0467] RenVecUPSTREAM: cebador sentido, se inicia la secuencia en dirección 5' de la región variable en vectores peak8 y a33xm.

5'-GCACTTGATGTAATTCTCCTTGG-3' (SEQ ID NO: 118)

35 RenVecDwnstrmHC: cebador antisentido se inicia la secuencia en dirección 3' de la región variable en plásmido de cadena pesada de peak8. Se hibrida en la región constante de HC no optimizada de codones.

5'-GAAGTAGTCCTTGACCAGG-3' (SEQ ID NO: 119)

RenVecDwnstrmLC: cebador antisentido, se inicia la secuencia en dirección 3' de la región variable en plásmido de la cadena ligera a33-xm-lc. Se hibrida en la región constante de LC no optimizada de codones.

40 5'-GAAGATGAAGACAGATGGTGAG-3' (SEQ ID NO: 120)

Upstrm Lonza: cebador sentido, se inicia la secuencia en dirección 5' de región variable en vectores Lonza pEE 12,4 y pEE 6,4. No se puede utilizar con Lonza combinado porque se trata de una región duplicada en el plásmido combinado.

5'-CGGTGGAGGGCAGTGAGTC 3' (SEQ ID NO: 121)

45 Dnstrm 6-4: cebador antisentido, se inicia la secuencia en dirección 3' de la región constante en el vector Lonza pEE 6.4

5'-GTGATGCTATTGCTTTATTTG -3' (SEQ ID NO: 122)

Dnstrm 12-4: cebador antisentido, se inicia la secuencia en dirección 3' de la región constante en el vector Lonza pEE 12,4

50 5'-CATACCTACCAGTTCTGCGCC-3' (SEQ ID NO: 123)

Cod-Opt const LC E: cebador sentido, interno a la región constante v-kappa de cadena ligera optimizada de codones
 5'-CCATCCTGTTTGCTTCTTTCC-3' (SEQ ID NO: 124)

Cod-Opt LC const F: cebador antisentido, interno a la región constante v-kappa de cadena ligera optimizada de codones (vk).

55 5'-GACAGGGCTGCTGAGTC -3' (SEQ ID NO: 125)

806HCspec: cebador sentido, interno y único para la versión remodelada de la región variable de HC de 806

5'-GTGCAGCTCCAAGAGAGTGGAC -3' (SEQ ID NO: 126)

806LCspec: cebador sentido, interno y único para la versión remodelada de la región variable de LC de 806

CAGAGTCCATCCAGCATGTC 5'-3' (SEQ ID NO: 127)

60 Un documento de texto con formato GenBank de la secuencia y anotaciones del plásmido 8C65AAG que codifica IgG1 hu806 se expone en la Figura 64.

La figura 53 se ha creado usando el Vector NTI (Invitrogen).

Las figuras 59-62 se crearon utilizando el Vector NTI AlignX.

65 Discusión

[0468] La remodelación del anticuerpo anti-receptor EGF 806 implicó la mutación de 14 aminoácidos en la cadena VH (Figura 59 y figura 62), y 12 cambios en la cadena VL (Figura 60 y Figura 61) con optimización de codones tal como se indica para la expresión en células CHO o NS0 de mamíferos. El vector de doble gen final, designado 8C65AAG, ha sido verificado en la secuencia, y se comprobó la secuencia codificante y la traducción. La unión al dominio extracelular de EGFR recombinante fue confirmada por análisis de Biacore utilizando el producto hu806 expresado transitoriamente.

[0469] Se han seleccionado clones individuales estables que producen altos niveles de anticuerpo hu806 intacto en un medio sin glutamina como recomienda LONZA. Los clones estables se han reducido gradualmente de suero para obtener cultivos libres de suero.

B. Caracterización In vitro e in vivo de hu806

[0470] Los transfectantes de hu806 Gs-CHO estable más productores 14D8, 15B2 y 40A10 y el transfectante 36 de hu806 GS-NS0 progresaron y se iniciaron cultivos a pequeña escala para permitir la purificación y caracterización del producto hu806 preliminar. Los resultados indicaron propiedades fisicoquímicas similares. Por consiguiente se realizó un cultivo en tanque agitado a mayor escala (15L) para el transfectante más productor (GS-CHO hu806 40A10) y el producto purificado se sometió a caracterización in vitro adicional y estudios de terapia in vivo en modelos de xenoinjertos U87MG.de2-7 y A431.

Metodología y Resultados

Producción y procesamiento corriente abajo:

Pequeña escala

[0471] Los experimentos en matraces de agitación se realizaron con matraces de agitación E500 con un volumen de cultivo celular de 100 ml. La figura 76 presenta tablas de viabilidad celular y productividad de anticuerpos para los cuatro transfectantes durante el cultivo. La concentración del producto se estimó mediante ELISA usando el anticuerpo anti-idiotipo 806 LMH-12 (Liu et al. (2003) Generation of anti-idiotypic antibodies for application in clinical immunotherapy laboratory analyses. Hybrid Hybridomics. 22 (4), 219-28) como anticuerpo de recubrimiento y el Lote clínico de ch806: J06024 como patrón. El material de recogida se centrifugó y el sobrenadante se filtró con filtro de 0,2 μ m, a continuación los anticuerpos se purificaron por afinidad mediante cromatografía de Proteína-A.

Gran Escala

[0472] Se cultivó la línea celular de transfectante CHO-K1SV que expresa el clon candidato de hu806 40A10 en un biorreactor de tanque agitado de 15L con alimentación de glucosa durante 16 días utilizando CD-CHO (Invitrogen)/L-metionina sulfoximina (MSX; Sigma) 25 μ M/suplementos GS (Sigma) como los medios de base. La figura 76C presenta el crecimiento celular y la producción volumétrica en el biorreactor de tanque agitado de 15L. El rendimiento final fue de 14,7 l a 58 mg/l mediante ELISA.

[0473] El material de recogida se centrifugó y el sobrenadante se filtró en filtro de 0,2 μ m, a continuación se concentró hasta 2 L usando membranas de 2 X 30K en un concentrador Pall Centrimate. Se aplicaron posteriormente alícuotas (4 X 500 ml) a una columna de proteína A de 250 ml y se eluyó con citrato 50 mM a pH 4,5 que contiene NaCl 200 mM. A continuación, se agrupó el anticuerpo eluido de las 4 carreras, se concentró y dializó en PBS, pH 7,4.

[0474] Los productos hu806 de los cultivos a pequeña y gran escala se cuantificaron mediante DO A280 nm. Las muestras de anticuerpos recuperadas de rProteína-A fueron evaluadas por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) (pequeña escala, Figura 77; gran escala, Figura 78), 4-20% Tris-glicina SDS-PAGE bajo condiciones reducidas y no reducidas (Figuras 79-81), y se realizó el enfoque isoeléctrico con un sistema de electroforesis Amersham Multiphor II en una placa Ampholine PAG (pH 3,5 a 9,5) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Figura 82).

[0475] Los anticuerpos hu806 purificados por afinidad con proteína-A mostraron picos de proteínas simétricas y perfiles de elución SEC idénticos al material de referencia clínico de ch806. Los perfiles de gel de SDS-PAGE fueron consistentes con una inmunoglobulina. El patrón de IEF indicó tres isoformas con un pI que va de 8,66 a 8,82, que era consistente con el pI calculado de 8,4 para la secuencia de proteína.

Análisis de unión

Análisis FACS

[0476] Las estimaciones de la concentración de anticuerpo determinada para cada muestra mediante DO A280 nm se utilizaron para el análisis FACS con las células A431 de la línea celular de adenocarcinoma (que contienen la

amplificación del gen de EGFR). Hemos observado anteriormente que el mAb806 se unió a aproximadamente el 10% de $\sim 2 \times 10^6$ wtEGFR expresados en las células tumorales A431 en comparación con el mAb528 específico de wtEGFR (Johns et al. (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 (3), 398-408). Las células se tiñeron con cualquiera de las cuatro muestras de hu806, un anticuerpo IgG2b irrelevante, o ch806 de control positivo; cada uno se evaluó a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. El control para el anticuerpo secundario solo también se incluyó [conjugado a FITC (específico de Fc) de anti hulgG de cabra]. Las curvas de unión de FACS compuestas se presentan en la Figura 83 y demuestran la tinción equivalente para todas las construcciones.

[0477] Las características de unión celular de la muestra de hu806 40A10 producida por el cultivo a gran escala también se evaluó mediante FACS para la unión a A431, así como células de glioma U87MG.de2-7 que expresan el receptor EGFRvIII variante (Johns et al., 2002). Los resultados representativos de los análisis duplicados se presentan en la Figura 84 y figura 85, respectivamente. Los controles incluían un anticuerpo IgG2b irrelevante (histogramas sombreados), ch806 o 528 (se une a tipo salvaje y de2-7 EGFR) tal como se indica.

[0478] El ch806 y el anticuerpo hu806 demostraron una tinción similar de las líneas celulares A431 y U87MG.de2-7, apoyando nuestras observaciones anteriores de que mAb806 reconocía específicamente el EGFR de2-7 y un subconjunto del EGFR sobreexpresado (Luwor et al. (2001) Monoclonal antibody 806 inhibits the growth of tumor xenografts expressing either de2-7 or amplified epidermal growth factor receptor (EGFR) but not wild-type EGFR. *Cancer Res.* 61 (14), 5355-61). Como se esperaba, el anticuerpo 528 tiñó las líneas celulares U87MG.de2-7 y A431 (Figuras 84 y 85).

Análisis de unión celular

[0479] Se evaluó la capacidad de unión a antígeno de los radioinmunoconjugados mediante ensayos de adsorción de células (Lindmo et al. (1984) Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J. Immunol. Methods.* 72 (1), 77-89) usando la línea celular de glioma U87MG.de2-7 y las células de carcinoma epidermoide A431 que expresan el gen de EGFR amplificado.

[0480] Las fracciones inmunorreactivas de radioconjugados de hu806 y ch806 se determinaron mediante la unión a células que expresan el antígeno en presencia de exceso de antígeno. Los resultados para la unión a células U87MG.de2-7 de ^{125}I -hu806 y ^{125}I -ch806 se presentan en la Figura 86A sobre el rango de concentraciones de células 20×10^6 a $0,03 \times 10^6$ células/muestra. Los resultados para la unión a células A431 de ^{125}I -hu806 y ^{125}I -ch806 se presentan en la Figura 86B sobre el rango de concentraciones de células 200×10^6 a $0,39 \times 10^6$ células/muestra.

[0481] Los análisis de Scatchard se utilizaron para calcular la constante de asociación (K_a) (Lindmo et al., 1984). La unión de niveles bajos (20 ng) de anticuerpo marcado solo se comparó con la unión en presencia de un exceso de anticuerpo no marcado. La fracción inmunorreactiva se tuvo en cuenta en el cálculo de la cantidad de anticuerpo reactivo libre como se describe anteriormente (Clarke et al. (2000) In vivo biodistribution of a humanized anti-Lewis Y monoclonal antibody (hu3S193) in MCF-7 xenografted BALB/c nude mice. *Cancer Res* 60 (17), 4804-11) y la unión específica (nM; anticuerpo total X % unido) se representó contra la unión específica/libre reactivo (Figuras 87 y 88). La constante de asociación se determinó a partir de la pendiente negativa de la línea.

[0482] La afinidad de unión por ^{125}I -hu806 que se une a EGFRvIII en células U87MG.de2-7 se determinó que era $1,18 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$. La K_a para ^{125}I -ch806 era $1,06 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$. Estas observaciones están de acuerdo con los resultados observados en los valores de K_a para ^{111}In -ch806 y ^{125}I -ch806 de $1,36 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ y $1,90 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, respectivamente, lo que es altamente comparable a la del mAb806 parental murino de $1,1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ (Panousis et al (2005) Engineering and characterization of chimeric monoclonal antibody 806 (ch806) for targeted immunotherapy of tumours expressing EGFR de2-7 or amplified EGFR. *Br. J. Cancer* 92 (6), 1069-1077).

[0483] El análisis de Scatchard sobre las células A431 demostró una unión de alta afinidad por ambos constructos 806 a una población menor de EGFR en estas células. La K_a para ^{125}I -ch806 fue de $0,61 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$; y para ^{125}I -hu806 la $K_a = 0,28 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$.

Análisis con biosensor

[0484] Los análisis con biosensor se realizaron en un biosensor BIAcore 2000 utilizando un chip sensor recubierto con carboximetildextrano (CM5). El chip se derivatizó en el canal 3 con el péptido epitopo de 806 (aminoácidos 287 a 302 de EGFR; SEQ ID NO: 14; ver la Solicitud de Patente de Estados Unidos No. 11/060.646, presentada el 17 de febrero de 2005; la solicitud de patente provisional de Estados Unidos No. 60/546.602, presentada el 20 de febrero 2004; y la solicitud de patente provisional de Estados Unidos No. 60/584.623, presentada el 1 de julio de 2004), usando química de acoplamiento de amina estándar. El canal 2 se derivatizó con un antígeno de control utilizado para la determinación de la idoneidad del sistema. El canal 1 se derivatizó con etanolamina y se utilizó como un canal de control de blanco para la corrección de los efectos del índice de refracción. Las muestras de hu806 se

diluyeron en tampón HBS (HEPES 10 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM; di-Na-EDTA 3,4 mM; Tween-20 al 0,005%), y se inyectaron alícuotas (120 ul) que contenían 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM y 300 nM sobre la superficie del chip sensor a un caudal de 30 ul/min. Después de la fase de inyección, la disociación se controló por tampón HBS que fluye sobre la superficie del chip durante 600s. El anticuerpo unido se eluyó y se regeneró la superficie del chip entre las muestras mediante la inyección de 20 ul de solución de hidróxido de sodio 10 mM. Se incluyó ch806 de control positivo. Los parámetros de unión se determinaron utilizando el modelo de unión en equilibrio del software BIAevaluation. La figura 89 presenta los sensogramas generados.

[0485] La unión dependiente de dosis se observó tanto con hu806 como con el control positivo, ch806, en el canal 3. La idoneidad del sistema fue confirmada por la unión dependiente de la dosis del anticuerpo monoclonal apropiado para controlar el canal 2. No se observó reactividad cruzada entre hu806 (o ch806) y el anticuerpo de control. Nuestros análisis determinaron que la K_D aparente ($1/K_a$) fue de 37 nM para hu806 y 94 nM para ch806.

Análisis de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo

[0486] Los análisis de ADCC se realizaron con una preparación de 40A10 de anticuerpos hu806 purificados con células de adenocarcinoma A431 diana y se aislaron células mononucleares efectoras nuevas de sangre periférica de donantes sanos. Brevemente, todos los análisis se realizaron por triplicado con 1) 1 ug/ml de cada anticuerpo en un intervalo de relaciones de células efectoras a células diana (E:T = 0,78:1 a 100:1) y también 2) a E:T = 50:1 en un intervalo de concentración de cada anticuerpo (3,15 ng/ml - 10 ug/ml). Se incluyeron controles para isotipo de anticuerpo, citotoxicidad espontánea y total por triplicado y los cálculos para la citotoxicidad específica fueron tal como se describe previamente (Panousis et al., 2005). Los resultados se presentan en la Figura 90.

[0487] El hu806 demostró consistentemente una actividad ADCC superior a la IgG1 ch806 quimérica. En el experimento representativo mostrado, hu806 a 1 ug/ml realizó una ADCC de 30% de citotoxicidad a diferencia del 5% de citotoxicidad de ch806.

Estudio de terapia de 806 in vivo

[0488] La eficacia terapéutica de hu806 se investigó utilizando xenoinjertos de adenocarcinoma A431 o de glioma U87MG-de2-7 establecidos en ratones desnudos BALB/c. Para establecer xenoinjertos, los ratones se inyectaron por vía subcutánea en la línea mamaria inguinal derecha e izquierda con 1×10^6 células de adenocarcinoma A431 o 1×10^6 células de glioma U87MG.de2-7 en 100 ul de PBS. El volumen tumoral (TV) se calculó mediante la fórmula $[(\text{longitud} \times \text{anchura}^2)/2]$ donde la longitud era el eje más largo y la anchura la medición en ángulos rectos con la longitud. En un experimento inicial, grupos de cinco ratones BALB/c desnudos ($n = 10$ tumores/grupo) con A431 o xenoinjertos U87MG.de2-7 establecidos recibieron tratamiento de 1 mg de anticuerpo hu806, o control del vehículo PBS mediante inyección IP. La terapia se administró en los días 6, 8, 11, 13, 15 y 18 para A431 y en los días 4, 6, 8, 11, 13 y 15 para las líneas celulares U87MG.de2-7 respectivamente. El promedio \pm SEM de los volúmenes tumorales hasta la terminación de los experimentos debido a consideraciones éticas de la carga tumoral se presentan en la figura 91 para el xenoinjerto A431 hasta el día 25, y en la figura 92 para xenoinjertos U87MG.de2-7 xenoinjertos hasta el día 31.

[0489] Las evaluaciones de terapia in vivo con hu806 mostraron una marcada reducción en el crecimiento de xenoinjertos A431 en comparación con el control del vehículo PBS. La curva de crecimiento del xenoinjerto A431 observada para hu806 fue altamente comparable con la del grupo de tratamiento con ch806. En los xenoinjertos de U87MG.de2-7 establecidos, el grupo de control de PBS fue sacrificado en el día 20. La terapia con hu806 demostró una reducción significativa en el crecimiento del tumor por el día 20 en comparación con los controles de PBS ($P < 0,001$), y continuó el retraso del crecimiento tumoral tras día 20 similar al grupo ch806.

Discusión

[0490] Los anticuerpos hu806 purificados por afinidad con proteína A muestran perfiles de elución de SEC idénticos al material de referencia clínica ch806, y los perfiles de gel de SDS-PAGE eran consistentes con una inmunoglobulina. El patrón de IEF era consistente con el pI previsto de 8,4.

[0491] A través de la unión celular de Scatchard y los análisis de unión a epítipo de Biosensor el anticuerpo hu806 mostró curvas de unión altamente comparables y parámetros de afinidad al anticuerpo ch806. La afinidad de unión de hu806 y ch806 a EGFRvIII y EGFR de tipo salvaje sobreexpresado son similares y en el intervalo nanomolar bajo. La unión celular a través de análisis FACS apoyó estas observaciones.

[0492] Además, el hu806 demuestra una ADCC notablemente mejorada sobre el constructo ch806 en células A431 positivas al antígeno diana.

[0493] Las evaluaciones terapéuticas in vivo con hu806 mostraron una marcada reducción en el crecimiento de xenoinjerto A431, que fue altamente comparable al grupo de tratamiento con ch806. En los xenoinjertos U87MG.de2-7 establecidos, la terapia con hu806 demostró una reducción significativa en el crecimiento tumoral por

día 20 en comparación con los controles de PBS y continuó el retraso del crecimiento tumoral después de 20 días de forma similar al grupo de ch806.

Ejemplo 23

5

Anticuerpo monoclonal 175

[0494] Como se ha expuesto en el Ejemplo 1, se seleccionó el clon 175 (IgG2a) para una caracterización adicional.

10

a. Materiales y métodos

Líneas celulares

15

[0495] Las líneas celulares U87MG.Δ2-7 transfectadas con Δ2-7EGFR (Huang et al. (1997) J. Biol. Chem. 272, 2927-2935) y las líneas celulares A431 (Ullrich et al. (1984) Nature. 309, 418-425) se han descrito anteriormente. La línea celular de próstata independiente de hormonas DU145 (Mickey et al. (1977) Cancer Res. 37, 4049-4058) se obtuvo de la ATCC (atcc.org).

20

[0496] Todas las líneas celulares se mantuvieron en DMEM (Life Technologies, Grand Island, NY) que contenía 10% de FCS (CSL, Melbourne), glutamina 2 mM (Sigma Chemical Co, St. Louis), y penicilina/estreptomina (Life Technologies, Grand Island). Además, la línea celular U87MG.Δ2-7 se mantuvo en 400 mg/ml de geneticina (Life Technologies, Inc, Grand Island). BAF/3 (Palacios et al. (1984) Nature. 309, 126-131) y líneas celulares de BAF/3 que expresan diferentes receptores de EGF (Walker et al. (2004) J. Biol. Chem. 279, 22387- 22398) se mantuvieron rutinariamente en RPMI 1640 (GIBCO BRL) suplementado con 10% de suero de ternera fetal (GIBCO BRL) y 10% de medio acondicionado WEHI-3B (Ymer et al. (1985). Nature 19-25; 317, 255-258) como fuente de IL-3. Todas las líneas celulares se cultivaron a 37°C en una atmósfera de aire/CO₂ (95%-5%).

25

Anticuerpos y péptidos

30

[0497] mAb806 y mAb175 se generaron en el Instituto Ludwig para la Investigación del Cáncer (LICR) New York Branch y fueron producidos y purificados en la Instalación para la Producción Biológica (Instituto Ludwig para la Investigación del Cáncer, Melbourne). La línea de fibroblastos murinos NR6_{ΔEGFR} se utilizó como inmunógeno. Se generaron hibridomas de ratón mediante la inmunización de ratones BALB/c por vía subcutánea cinco veces a intervalos de 2 a 3 semanas, con 5 X 10⁵- 2 X 10⁶ células en adyuvante. Se utilizó adyuvante completo de Freund para la primera inyección. A partir de entonces, se utilizó adyuvante incompleto de Freund (Difco). Se fusionaron células del bazo de ratones inmunizados con línea celular de mieloma de ratón SP2/0. Los sobrenadantes de los clones recién generados fueron seleccionados en ensayos de hemoadsorción para la reactividad con la línea celular NR6, NR6_{wEGFR} y NR6_{ΔEGFR} y a continuación se analizaron mediante ensayos de hemoadsorción con líneas celulares de glioblastoma humana U87MG, U87MG_{wEGFR} y U87MG_{ΔEGFR}.

35

40

[0498] Los mAbs intactos (50 mg) se digirieron en PBS con papaína activada durante 2-3 horas a 37°C en una relación de 1:20 y la papaína se inactivó con yodoacetamida. A continuación, la digestión se pasó sobre una columna de Proteína-A Sepharose (Amersham) en tampón de fosfato de sodio 20 mM pH 8,0, con flujo se purificó adicionalmente por intercambio catiónico usando una columna Mono-S (Amersham). A continuación, la proteína se concentró usando un concentrador centrífugo de MWCO 10.000 (Millipore). Para los complejos Fab-péptido se añadió un exceso molar de péptido liofilizado directamente al Fab y se incubó durante 2 horas a 4°C antes de establecer ensayos de cristalización.

45

Mapeo de mAb175 usando fragmentos de EGFR expresados en células de mamífero

50

[0499] El día antes de la transfección con estos fragmentos, se sembraron fibroblastos de riñón embrionario 293T humanos a 8 X 10⁵ por pocillo en placas de cultivo de tejido de 6 pocillos que contenían 2 ml de medio. Las células fueron transfectadas con 3-4 ug de ADN de plásmido formando complejo con Lipofectamine 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. 24 a 48 h después de la transfección, los cultivos celulares se aspiraron y se lisaron las monocapas de células en 250 ul de tampón de lisis (1% Triton X-100, 10% de glicerol, NaCl 150 mM, 50 mM HEPES pH 7,4, 1 mM EGTA y mezcla completa de de inhibidores de proteasas (Roche). Se mezclaron partes alícuotas de lisado celular (10-15 ul) con tampón de muestra de SDS que contenía 1,5% de β-mercaptoetanol, se desnaturalizaron por calentamiento durante 5 min a 100°C y electroforesis en geles al 10% de NuPAGE Bis-Tris poliacrilamida (Invitrogen). Las muestras a continuación se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa que se enjuagaron en tampón TBST (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM de NaCl y 0,1% de Tween-20) y se bloquearon en TBST que contenía leche desnatada al 2,5% durante 30 min a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron durante la noche a 4°C con 0,5 ug/ml de mAb175 en tampón de bloqueo. Las membranas paralelas se sondaron durante una noche con mAb 9B11 (1:5000, Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts) para detectar el epítipo c-myc. Las membranas se lavaron en TBST, y se incubaron en tampón de bloqueo que contenía IgG de conejo anti-ratón conjugada a peroxidasa de rábano picante (BioRad) a una dilución 1:5000 durante 2 h a

55

60

65

temperatura ambiente. Las transferencias se lavaron a continuación en TBST, y se revelaron usando una película autorradiográfica después de la incubación con sustrato quimioluminiscente Western Pico (Pierce, Rockford, Illinois).

Mapeo de mAb175 usando fragmentos de EGFR expresados en células de mamífero y levadura

[0500] Una serie de fragmentos de ectodominio EGFR etiquetados con c-myc solapantes, comenzando en los residuos 274, 282, 290 y 298 y todos terminando en el aminoácido 501 y fusionados a la hormona de crecimiento se han descrito previamente (Johns et al. (2004) J. Biol. Chem. 279, 30.375-30.384). La expresión de proteínas EGFR en la superficie de células de levadura se realizó como se ha descrito previamente (Johns et al., 2004).

[0501] Brevemente, las colonias transformadas se cultivaron a 30°C en medio mínimo que contenía base de nitrógeno de levadura, hidrolizado de caseína, dextrosa, y tampón fosfato pH 7,4, en una plataforma de agitación durante aproximadamente un día hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 5-6. Las células de levadura se indujeron a continuación para la expresión de proteínas mediante la transferencia a medios mínimos que contienen galactosa, y se incubaron con agitación a 30°C durante 24 h. Los cultivos se almacenaron a continuación a 4°C hasta su análisis. Se obtuvo fluido ascítico crudo que contenía el anticuerpo monoclonal c-myc 9E10 de Covance (Richmond, CA). Se lavaron 1 X 10⁶ células de levadura con tampón de FACS enfriado con hielo (PBS que contiene 1 mg/ml de BSA) y se incubaron con fluido ascítico anti-c-myc (dilución 1:50), o anticuerpo monoclonal de EGFR humano (10 ug/ml) en un volumen final de 50 ul, durante 1 hora a 4°C. Las células se lavaron a continuación 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 ul durante 1 h a 4°C, protegido de la luz. Después de lavar las células de levadura con tampón de FACS enfriado con hielo, los datos de fluorescencia se obtuvieron con un citómetro de flujo Coulter Epics XL (Beckman-Coulter), y se analizaron con software de citometría WinMDI (J. Trotter, Universidad Scripps). Para la determinación de epítomos lineales frente a epítomos conformacionales, las células de levadura se calentaron a 80°C durante 30 min, a continuación se enfriaron en hielo 20 min antes del marcaje con anticuerpos. La serie de mutantes de EGFR enumerados en la Tabla 7 se han descrito previamente (Johns et al., 2004).

Resonancia de plasmón superficial (BIAcore)

[0502] Se utilizó un BIAcore 3000 para todos los experimentos. Los péptidos que contienen el supuesto epítopo de mAb806 fueron inmovilizados en un chip sensor CM5 utilizando acoplamiento con amina, tiol o Pms a una velocidad de flujo de 5 ul/min (Wade et al. (2006) Anal. Biochem. 348, 315-317). El mAb806 y mAb175 se pasaron sobre la superficie del sensor a una velocidad de flujo de 5 ul/min a 25°C. Las superficies se regeneraron entre las carreras mediante la inyección de HCl 10 mM a una velocidad de flujo de 10 ul/min.

Inmunoprecipitación y transferencia Western

[0503] Las células se lisaron con tampón de lisis (1% Triton X-100, 30 mM HEPES, NaCl 150 mM, 500 mM bencenosulfoni fluoruro de 4-(2-aminoetil), 150 nM de aprotinina, 1 mM de inhibidor de proteasa E-64, 0,5 mM EDTA, y leupeptina 1 mM, pH 7,4) durante 20 minutos, se clarificaron por centrifugación a 14.000 xg durante 30 minutos, se inmunoprecipitaron con los anticuerpos pertinentes a una concentración final de 5 ug/ml durante 60 minutos y se capturaron por partículas de Sepharose-A durante la noche. Las muestras se eluyeron a continuación con 2X tampón de muestra SDS NuPAGE (Invitrogen), se separaron en geles de NuPAGE (ya sea 3-8% o 4-12%), se electrotransferieron sobre membrana de transferencia Immobilon-P (Millipore) y a continuación se sondaron con los anticuerpos pertinentes antes de la detección por radiografía quimioluminiscencia.

Inmunohistoquímica

[0504] Las secciones congeladas se tiñeron con 5 ug/ml de mAb175 o control de isotipo irrelevante durante 60 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo unido se detectó usando el sistema de detección de Dako Envision + HRP según las instrucciones del fabricante. Las secciones fueron finalmente enjuagadas con agua, se contratiñeron con hematoxilina y se montaron.

Modelos de xenoinjerto

[0505] Se inocularon s.c. células U87MG.Δ2-7 células (3 X 10⁶) en 100 ul de PBS en ambos flancos de ratones desnudos Balb/c hembras de 4 a 6 semanas de edad (Centro de Investigación Animal, Perth, Australia). Se realizaron todos los estudios utilizando modelos de tumores establecidos tal como se describió anteriormente (Perera et al., (2005) Clin. Cancer Res. 11, 6390-6399). El tratamiento se inició una vez que los tumores habían alcanzado el volumen promedio indicado en la leyenda de la figura correspondiente. El volumen del tumor en mm³ se determinó usando la fórmula (longitud X anchura²)/2, donde la longitud era el eje más largo y la anchura era la medición perpendicular. Los datos se expresan como el volumen tumoral promedio ± SE para cada grupo de tratamiento. Todos los datos se analizaron para la significación por la prueba t de Student de un lado donde p <0,05 se consideró estadísticamente significativo. Este proyecto de investigación fue aprobado por el Comité de Ética Animal del Hospital de Austin.

Generación y caracterización de líneas celulares estables que expresan los constructos mutantes de EGFR

[0506] Las mutaciones del wtEGFR se generaron utilizando un kit de mutagénesis dirigida al sitio (Stratagene, La Jolla, CA). La plantilla para cada mutagénesis fue el ADNc de EGFR humano (número de acceso x00588) (Ullrich et al. (1984) Nature. 309, 418-425). La secuenciación de nucleótidos automatizada de cada constructo se realizó para confirmar la integridad de las mutaciones de EGFR. Los EGFR de tipo salvaje y mutante (C173A/C281A) se transfectaron en células BaF/3 por electroporación.

[0507] Las líneas celulares estables que expresan el EGFR mutante se obtuvieron por selección en medio que contenía neomicina. Después de la selección final, se aisló el ARNm de cada línea celular, se transcribió de forma inversa y se amplificó la secuencia de EGFR por PCR. Todas las mutaciones en el EGFR expresado fueron confirmadas por secuenciación de los productos de PCR. El nivel de expresión de EGFR se determinó mediante análisis FACS en un FACStar (Becton y Dickinson, Franklin Lakes, NJ) utilizando el anticuerpo anti-EGFR mAb528 (Masui et al (1984) Cancer Res 44, 1002-1007; Gill et al. (1984) J. Biol Chem 259, 7755-7760) a 10 ug/ml en PBS, 5% de FCS, EDTA 5 mM seguido por IgG anti-ratón marcado con Alexa 488 (dilución final 1:400). La fluorescencia de fondo se determinó incubando las células con un anticuerpo primario irrelevante de la misma clase. Todas las células se pasaron rutinariamente en RPMI, FCS al 10%, medio acondicionado con WEHI3B al 10% y G418 1,5 mg/ml.

Activación dependiente de EGF de EGFR mutante

[0508] Las células que expresan el wtEGFR o EGFR C271A/C283A se lavaron y se incubaron durante 3 horas en medio sin suero o IL-3. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en medio que contenía EGF (100 ng/ml) o un volumen equivalente de PBS. Las células se recogieron después de 15 minutos, se sedimentaron y se lisaron directamente en tampón de muestra SDS/PAGE que contenía p-mercaptoetanol. Las muestras se separaron en geles en gradiente de NuPAGE 4-12%, se transfirieron a membrana de PVDF Immobilon y se sondaron con anti-fosfotirosina (4G10, Upstate Biotechnologies) o anticuerpos anti-EGFR (mAb806, producido en LICR). Las bandas reactivas se detectaron utilizando quimioluminiscencia.

Efecto del EGF y los anticuerpos sobre la proliferación celular

[0509] Las células que crecen en fase logarítmica se recogieron y se lavaron dos veces con PBS para eliminar la IL-3 residual. Las células se resuspendieron en RPMI 1640 más FCS al 10% y se sembraron en placas de 96 pocillos a 10^5 células/pocillo sólo con vehículo o con concentraciones crecientes de EGF. Según fuera apropiado, también se añadió una concentración fija de mAb528 o mAb806 (2 ug/pocillo) a los cultivos. La proliferación se determinó utilizando el ensayo MTT (van de Loosdrecht et al. (1994) J. Immunol. Methods. 174, 311-320).

Reactividad con anticuerpos específicos de conformación

[0510] Las células se recogieron por centrifugación y se tiñeron con los anticuerpos de control o de prueba (todos a 10 ug/ml en tampón FACS durante 40 min en hielo, se lavaron en tampón FACS), seguido por Ig anti-ratón marcado con Alexa 488 (dilución final 1:400, 20 minutos en hielo). Las células se lavaron con tampón FACS enfriado con hielo, se recogieron por centrifugación, y se analizaron en un FACScan; el canal de fluorescencia máxima y la fluorescencia media se determinaron para cada muestra con la función estadística en Cell Quest (Becton y Dickinson). Se restó la fluorescencia base (control negativo) de todas las mediciones. Los valores de fluorescencia media fueron elegidos como más representativos de la forma del pico y la intensidad de fluorescencia y se utilizaron para derivar la relación de unión de mAb806 con respecto a mAb528.

Determinaciones de la estructura cristalina de Fab 175, y Fab 806, complejos de péptido-Fab y la estructura de RMN del epítipo de péptido 806 en solución

[0511] Las estructuras fueron determinadas por reemplazo molecular y refinamiento convergidos con $R = 0,225/R_{libre} = 0,289$ para Fab806 y $R = 0,226/R_{libre} = 0,279$ para Fab806: péptido;

[0512] $R = 0,210/R_{libre} = 0,305$ para Fab806 y $R = 0,203/R_{libre} = 0,257$ para Fab806:péptido.

[0513] Los cristales del 806 Fab nativo se desarrollaron mediante difusión de vapor de gota colgante usando 10 mg/ml de Fab y un depósito que contenía tampón de acetato de sodio 0,1 M, pH 4,6, 6-8% PEG6000 y 15-20% de isopropanol. Para la recogida de datos, los cristales se transfirieron a una solución crioprotectora que contenía tampón de acetato de sodio 0,1 M, pH 4,6, 10% PEG6000, 15-20% de isopropanol y 10% de glicerol. Los cristales se montaron entonces en un bucle de nylon y se congelaron súbitamente directamente en nitrógeno líquido.

[0514] Los cristales del complejo Fab 806-péptido se desarrollaron mediante difusión de vapor de gota colgante usando 10 mg/ml de complejo Fab-péptido y un depósito que contenía acetato de amonio 0,2 M, 16-18% de PEG 5000 monometiléter, la calidad de los cristales se mejoró a continuación a través de técnicas de siembra. Para la recogida de datos, los cristales se transfirieron a una solución crioprotectora que consistía en un depósito

suplementado con glicerol al 25%. Los cristales se montaron entonces en un bucle de nylon y se congelaron súbitamente directamente en nitrógeno líquido.

[0515] Los cristales del complejo Fab 175-péptido se desarrollaron inicialmente por difusión de interfase libre con un sistema de cristalización Topaz (Fluidigm, San Francisco). Los microcristales se desarrollaron mediante difusión de vapor de gota colgante usando 7 mg/ml de Fab con condiciones similares de tampón Bis-tris propano 0,1 M, acetato de amonio 0,2 M y PEG 10.000 al 18%. Los microcristales se mejoraron mediante la siembra con estricción en formiato de sodio 0,15 M y PEG 1500 al 15% para producir cristales de forma de placa pequeña. Para la recogida de datos, los cristales se transfirieron a una solución crioprotectora que consistía en un depósito suplementado con glicerol al 25%. Los cristales se montaron entonces en un bucle de nylon y se congelaron súbitamente directamente en nitrógeno líquido.

[0516] Los datos de difracción en los cristales de los complejos de Fab 806 y Fab 175 se recogieron a nivel interno usando un detector R-AXIS IV en un generador Rigaku Micromax-007 equipado con óptica AXCO, estos datos fueron procesados utilizando CrystalClear. Los datos del complejo Fab 806-péptido se recogieron en un detector CCD quantum315 ADSC en línea de luz X29, Laboratorio Nacional de Brookhaven, estos datos fueron procesados con HKL2000 (Otwinowski, Z. y Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. Academic Press (Nueva York)) (las estadísticas de recogida de datos se muestran en la Tabla 9). El Fab 806 nativo se resolvió mediante reemplazo molecular usando el programa MOLREP (Vagin, A. y Teplyakov, A. (1997) J. Appl. Cryst. 30, 1022-1025), utilizando las coordenadas de la estructura Fab 2E8. El refinamiento de la estructura se realizó en REFMAC5 (Murshudov et al. (1997) Acta Crystallographica 53, 240-255) y la construcción de modelos en Coot (Emsley, P. y Cowtan, K. (2004) Acta Crystallographica 60, 2126-2132).

[0517] Las estructura tanto del péptido 806 como del péptido-Fab175 se resolvieron por reemplazo molecular usando el programa MOLREP usando las coordenadas de la estructura Fab 806, el refinamiento y reconstrucción se realizaron de nuevo en REFMAC5, y COOT y O. La validación de las estructuras finales se realizó con PROCHECK (Laskowski et al. (1993) J. Appl. Cryst 26, 283-291) y WHATCHECK (Hooft et al. (1996) Nature 381, 272).

Estudios de RMN

[0518] Para los estudios de RMN, se produjo péptido marcado con ^{15}N de forma recombinante como una fusión con el dominio SH2 de SHP2 utilizando el método descrito previamente por Fairlie et al. (Fairlie et al. (2002) Protein Expression and Purification 26, 171-178), excepto que el E. coli se desarrolló en medio mínimo de Neidhardt suplementado con $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (Neidhardt et al. (1974) Journal of Bacteriology 119, 736 -747). El péptido se escindió de la pareja de fusión usando CNBr, se purificó por HPLC de fase inversa y su identidad fue confirmada por espectrometría de masas MALDI-TOF y secuenciación N-terminal. El residuo de metionina dentro de la secuencia de unión al anticuerpo 806 se mutó a leucina para permitir la escisión de la pareja de fusión, pero no dentro del propio péptido.

[0519] Las muestras utilizadas para estudios de RMN se prepararon en solución H_2O que contenía H_2O_2 al 5%, NaCl 70 mM y NaPO_4 50 mM a pH 6,8. Todos los espectros se obtuvieron a 298K en un espectrómetro Bruker Avance500 utilizando una criosonda. Las asignaciones secuenciales del péptido en ausencia de m806Fab se establecieron utilizando TOCSY 2D y NOESY estándar, así como espectros TOCSY y NOESY editados con ^{15}N . La interacción entre el péptido y fAb806 se examinó mediante el control de los espectros HSQC ^{15}N del péptido en ausencia y presencia de fAb806. La perturbación espectral de los espectros HSQC ^{15}N del péptido en presencia de fAb806 indica claramente que el péptido era capaz de unirse a fAb806 bajo la presencia de las condiciones de solución. La conformación detallada del péptido en la forma compleja no se determinó. Las desviaciones de los valores de desplazamiento químico de conformación al azar para el péptido mAb806 se muestran en la figura 93.

Biodistribución de tumor chAb806 tumoral en pacientes

[0520] Para demostrar la especificidad de tumor de mAb806 in vivo, se diseñó una versión quimérica (ch806) y se produjo en condiciones de cGMP (Panousis et al. (2005) Br. J. Cancer. 92, 1069-1077). Se realizó una prueba en fase I en humanos para evaluar la seguridad, biodistribución y la respuesta inmune de ch806 en pacientes con tumores positivos 806, y los resultados de la seguridad, la biodistribución y la farmacocinética se han descrito anteriormente (2007) (Scott et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104, 4071-4076). Para definir la especificidad de ch806 en tumor en comparación con el tejido normal (es decir, el hígado) en pacientes, se realizó la absorción cuantitativa de ch806 en tumor e hígado mediante el cálculo del % de dosis inyectada (ID) de ^{111}In -ch806 a partir de las imágenes de la cámara gamma de todo el cuerpo durante una semana después de la inyección de 5-7 mCi (200-280MBq) ^{111}In -ch806. Los cálculos de dosimetría del hígado y el tumor se realizaron en base a las regiones de interés en cada paciente individual. El conjunto de datos de la imagen de infusión de ^{111}In -ch806, corregida para el fondo y la atenuación, permite el cálculo de la actividad acumulada. El cálculo de la dosimetría se realizó para obtener la concentración de ^{111}In -ch806 en el tumor y el hígado durante un período de una semana posterior a la inyección.

b. Secuenciación

[0521] Las cadenas pesada variable (VH) y ligera variable (VL) de mAb175 se secuenciaron, y sus regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) se identificaron de la siguiente manera:

5 [0522] cadena VH de mAb175: las secuencias de ácido nucleico (SEQ ID NO: 128) y aminoácidos (SEQ ID NO: 129) se muestran en las figuras 74A y 74B, respectivamente. Las regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2, y CDR3 (SEQ ID NOS: 130, 131, y 132, respectivamente) se indican mediante subrayado en la figura 74B.

10 [0523] cadena VL de mAb175: las secuencias de ácido nucleico (SEQ ID NO: 133) y aminoácidos (SEQ ID NO: 134) se muestran en las figuras 75A y 75B, respectivamente. Las regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2, y CDR3 (SEQ ID NOS: 135, 136, y 137, respectivamente) se indican mediante subrayado en la figura 75B.

15 [0524] Los datos de secuencia para mAb175 se basan en datos de secuencia y estructura cristalina, ya que la línea celular no es clonal, y por lo tanto se han obtenido múltiples secuencias de la línea celular. Las secuencias de mAb175 expuestas anteriormente se han sido confirmado mediante la estructura cristalina, y difieren en un solo aminoácido en cada una de CDR1 y CDR2 de la cadena VL de las secuencias anteriores basadas en datos de la secuencia estándar sola. También se ha obtenido un isotipo diferente de mAb175 (un isotipo IgG2a inusual) también se ha obtenido, basado en los datos de secuencia final y estructura cristalina datos.

20 Especificidad de mAb175

[0525] Los estudios preliminares de unión sugirieron que mAb175 mostraba una especificidad similar para EGFR como mAb806. En las regiones CDR de mAb806 (IgG2b) y mAb175 (IgG2a), las secuencias de aminoácidos son casi idénticas, con sólo un aminoácido de diferencia en cada uno (Figura 65; véase el Ejemplo 26, a continuación).
25 Todas estas diferencias preservan la carga y el tamaño de las cadenas laterales. Es evidente que estos anticuerpos han surgido independientemente.

c. Experimentos

30 [0526] Se llevaron a cabo un conjunto de experimentos de inmunohistoquímica para analizar la especificidad de la unión de mAb175. mAb175 tiñe secciones de xenoinjertos A431 que sobreexpresan el EGFR (Figura 66A) y secciones de xenoinjertos de glioma U87MG.Δ2-7 que expresan el Δ2-7EGFR (Figura 66A). En cambio, mAb175 no tiñe secciones de xenoinjertos de U87MG. La línea celular U87MG solamente expresa niveles modestos del EGFR de tipo salvaje (Figura 66A) y no tiene un bucle autocrino de EGFR detectable. Lo más importante, mAb175 no se une a las secciones de hígado humano normal (Figura 66B). Por lo tanto, mAb175 parece demostrar la misma especificidad que mAb806, es decir, detecta EGFR humano sobreexpresado y truncado, pero no el wtEGFR expresado a niveles modestos.

40 Identificación del epítipo mAb175

[0527] Dado que mAb175 también se une al Δ2-7EGFR, en el que se eliminan los aminoácidos 6-273, y EGFR₁₋₅₀₁, el epítipo de mAb175 debe estar contenidos en los residuos 274-501. Al determinar el epítipo de mAb806, expresamos una serie de fragmentos de EGFR etiquetados con c-myc fusionados al extremo carboxilo de GH humana, todos terminando en el aminoácido 501 (Chao et al. (2004) J. Mol. Biol. 342, 539-550; Johns et al (2004) J. Biol Chem 279, 30375-30384).

[0528] El mAb175 también reaccionó con los fragmentos de EGFR 274 a 501 y 282 a 501 en transferencias Western, pero no detectó fragmentos que comienzan en el aminoácido 290 o 298 (Figura 73). La presencia de todas las proteínas de fusión GH-EGFR se confirmó usando el anticuerpo c-myc, 9E10 (Figura 73). Por lo tanto, se localiza un determinante crítico del epítipo mAb175 cerca del aminoácido 290. Finalmente, un fragmento de EGFR 274 a 501 con el epítipo de mAb806 suprimido (Δ287-302) también fue negativo para la unión de mAb175 (Figura 73), lo que sugiere que esta región determinaba de forma similar la mayor parte de la unión de mAb175.

55 [0529] Se utilizó un segundo enfoque para caracterizar adicionalmente el epítipo de mAb175. Los fragmentos que abarcan los dominios extracelulares del EGFR se expresaron en la superficie de la levadura y se ensayaron para la unión a mAb175 mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando citometría de flujo. El mAb175 reconoció el fragmento de levadura 273 a 621, que corresponde al dominio extracelular del EGFR Δ2-7, pero no a los fragmentos 1-176, 1-294, 294-543, o 475-621 (Figura 67A y figura 67B). Por lo tanto, al menos parte del epítipo de mAb175 debe estar contenido dentro de la región entre los aminoácidos 274 a 294, de acuerdo con los datos de inmunotransferencia usando fragmentos de EGFR. Dado que mAb175 se une al fragmento desnaturalizado de 273-621 (Figura 67C), el epítipo debe ser lineal en la naturaleza (Figura 73). Está claro que mAb806 y mAb175 reconocen una región y conformación similar del EGFR.

65 [0530] Usando resonancia de plasmón superficial (BIAcore) se investigó la unión de mAb175 al péptido EGFR_(287CGADSYEMEEDGVRKC302); SEQ ID NO: 138). El EGFR₂₈₇₋₃₀₂ se inmovilizó sobre la superficie de biosensor

usando amina, el intercambio tiol-disulfuro o químicas de acoplamiento Pms-Ser. El último método inmoviliza el péptido exclusivamente a través de la cisteína N-terminal (Wade et al. (2006) Anal. Biochem., 348, 315-317).

5 **[0531]** mAb175 se unió al EGFR₂₈₇₋₃₀₂ en todas las orientaciones (Tabla 6). La afinidad de mAb175 para EGFR₂₈₇₋₃₀₂ varió de 35 nM para el acoplamiento Pms-serina a 154 nM para el acoplamiento de amina. En todos los casos, la afinidad de unión de mAb175 para EGFR₂₈₇₋₃₀₂ fue menor que la obtenida para mAb806 (Tabla 6). También se determinó la afinidad de mAb175 a dos fragmentos extracelulares diferentes del EGFR. mAb175 se unió al fragmento 1-501 con una afinidad similar a la obtenida usando el péptido (16 nM frente a 35 nM) (Tabla 6). Como era de esperar, la afinidad de mAb175 frente al dominio extracelular de longitud completa 1-621, que puede formar la conformación unida, fue mucho menor (188 nM). Aunque mAb806 y mAb 175 tienen afinidades similares para EGFR₂₈₇₋₃₀₂, mAb175 parece mostrar una mayor afinidad por el dominio extracelular del EGFR (Tabla 6). Claramente, el epítipo de mAb175 está contenido dentro del EGFR 287-302 y, como mAb806, la afinidad de unión al dominio extracelular del EGFR es dependiente de la conformación.

15 Tabla 6

Determinación BIAcore de afinidades de anticuerpo para la unión de mAb806 y mAb175 a epítipos de EGFR		
Fragmento de EGFR	K _D para mAb175	K _D para mAb806 (nM)
287-302 (acoplamiento Pms-Ser)	35	16
287-302 (acoplamiento de tiol)	143	84
287-302 (acoplamiento de amina)	154	85
1-501 (incapaz de formar unión)	16	34
1-621 (puede formar unión)	188	389

20 **[0532]** El panel de mutantes del fragmento 273-621 de EGFR, expresado en la superficie de levadura (Chao et al (2004) J. Mol Biol 342, 539-550; Johns et al (2004) J. Biol. Chem. 279, 30.375-30.384), se utilizó para caracterizar la estructura fina del epítipo de mAb175. mAb175 y mAb806 mostraron un patrón casi idéntico de reactividad a los mutantes (Tabla 7). La alteración del enlace disulfuro 287-302 sólo tuvo un efecto moderado sobre la reactividad del epítipo como el anticuerpo unido a todos los mutantes en C287 y a algunos, pero no todos los mutantes en C302 (Tabla 7). Los aminoácidos esenciales para la unión de mAb175 incluyen E293, G298, V299, R300 y C302 (Tabla 7). mAb175 pareció moderadamente más sensible a las mutaciones V299 y D297 pero mAb806 también mostró una unión reducida a algunas mutaciones en estos sitios (Tabla 7). Una vez más, el epítipo de mAb175 parece ser esencialmente el mismo que el epítipo reconocido por mAb806.

25

Tabla 7

Expresión de mutaciones 287-302 de epítipo de EGFR en levadura y las puntuaciones de unión para mAb806 y mAb175		
Mutante de EGFR	Unión de mAb806	Unión de mAb175
C287A	+	+
C287G	+	+
C287R	+	+
C287S	+	+
C287W	+	+
C287Y	+	+
G288A	++	++
A289K	++	++
D290A	++	++
S291A	++	++
Y292A	++	++
E293A	+	+
E293D	+	+
E293G	+	+
E293K	-	-
M294A	++	++
E295A	++	++
E296A	++	++
D297A	++	+ en contacto
D297Y	+	+
G298A	+	+
G298D	-	-
G298S	-	-
V299A	++	+ en contacto
V299D	-	-

V299K	++	+ en contacto
R300A	++	++
R300C	+	+
R300P	-	-
K301A	++	++
K301E	+	+
C302A	-	-
C302F	+	+
C302G	-	-
C302R	+	+
C302S	-	-
C302Y	+	+

Eficacia de mAb175 contra xenoinjertos de tumores estimulados por Δ 2-7EGFR o un bucle autocrino de EGFR

5 **[0533]** Se examinó la actividad antitumoral in vivo de mAb806 y mAb175 contra xenoinjertos de glioma U87MG. Δ 2-7. Se dejó que los xenoinjertos se establecieran durante 6 días antes de comenzar la terapia de anticuerpos (3 veces a la semana durante 2 semanas en los días indicados). En este momento, el volumen tumoral promedio fue de 100 mm³ (Figura 68A). El tratamiento con mAb175 dio lugar a una reducción de la tasa global de crecimiento del tumor en comparación con el tratamiento con vehículo o mAb806 y fue altamente significativa en el día 19 después de la inoculación (P <0,0001 frente al control y P <0,002 frente a mAb806), cuando el grupo de control fue sacrificado por razones éticas. El volumen tumoral promedio en este momento fue 1.530, 300 y 100 mm³ para el vehículo, grupos de tratamiento con mAb806 y mAb175, respectivamente (Figura 68A), confirmando la actividad antitumoral de la actividad de mAb175 contra xenoinjertos que expresan el Δ 2-7 EGFR.

15 **[0534]** A pesar de que las células U87MG expresan aproximadamente 1 X 10⁵ EGFR por célula, mAb806 no es capaz de reconocer ninguno de los EGFR de la superficie, y sin ser sorprendente, no inhibe el crecimiento in vivo de U87MG. Además, estas células no coexpresan ningún ligando de EGFR. Se realizó un estudio para ver si el epítipo de EGFR se expone transitoriamente, y por lo tanto es capaz de ser reconocido por mAb806 y mAb175 en células que contienen un bucle autocrino de EGFR. La línea celular de próstata DU145 expresa el wtEGFR a niveles similares a los observados en las células U87MG, sin embargo a diferencia de las células U87MG, las células DU145 contienen una amplificación del gen TGF-alfa y por lo tanto exhiben un bucle autocrino EGFR/TGF- α . Tanto mAb175 como 806 se unen a las células DU145 tal como se determina por análisis FACS (Figura 68B) y ambos son capaces de inmunoprecipitar una pequeña proporción del EGFR extraído de estas células (Figura 68C). Ambas técnicas mostraron una mayor unión de mAb175, sin embargo, cuando se compara con mAb528, que se une al dominio L2, mAb175 y mAb806 sólo se unen a un subconjunto de EGFR en la superficie de estas células (Figura 20 68B y figura 68C). Se obtuvieron observaciones similares con una segunda línea celular de próstata (LnCap); (datos no mostrados) y una línea de colon (LIM1215), ambos de los cuales también contienen bucles autocrinos de EGFR (Sizeland, AM y Burgess, AW (1992) Mol Cell Biol 3, 1235-1243; Sizeland, AM y Burgess, AW (1991) Cell Mol Biol. 11, 4005-4014). Claramente, mAb806 y mAb175 pueden reconocer sólo una pequeña proporción del EGFR en células en presencia de un bucle autocrino de estimulación.

30 **[0535]** Dado que mAb175 y mAb806 se unen más efectivamente al EGFR expresado en células DU145 que las células U87MG, se llevó a cabo un estudio para analizar la actividad antitumoral de estos anticuerpos en xenoinjertos de DU145 crecidos en ratones desnudos. Se permitió que los xenoinjertos se establecieran durante 18 días antes de comenzar la terapia (3 veces a la semana durante 3 semanas en los días indicados). En este momento el volumen tumoral promedio fue de 90 mm³ (Figura 68D). Tanto mAb175 como mAb806 inhibieron el crecimiento de xenoinjertos de DU145. El grupo de control fue sacrificado en el día 67 y tenía un volumen tumoral promedio de 1.145 mm³ en comparación con 605 y 815 mm³ para los grupos mAb806 y mAb175 respectivamente (p <0,007 y 0,02, respectivamente) (Figura 68D).

Estructura 3D de EGFR₂₈₇₋₃₀₂ en contacto con los fragmentos Fab de mAb806 y mAb175

45 **[0536]** A fin de comprender los detalles moleculares de cómo mAb806 y mAb175 podían reconocer EGFR en algunas, pero no todas las conformaciones, se determinaron las estructuras cristalinas de los fragmentos Fab para ambos anticuerpos en complejo con el epítipo de EGFR₂₈₇₋₃₀₂ oxidado (a una resolución de 2,0 y 1,59 Å, respectivamente, Figura 69A y 69B) y solos (a una resolución de 2,3 Å y 2,8 Å, respectivamente). En ambos casos, las estructuras de Fab libres y complejas fueron esencialmente las mismas y las conformaciones del péptido y los bucles de CDR de los anticuerpos estaban bien definidas (Figura 69). El epítipo adopta una estructura de cinta-beta, con un extremo de la cinta que apunta hacia el Fab y V299 enterrado en el centro del sitio de unión al antígeno (Figuras 69C-E). Ambos extremos del epítipo están expuestos al disolvente, en consonancia con estos anticuerpos que se unen a polipéptidos mucho más largos.

50 **[0537]** De los 20 residuos de anticuerpos en contacto con el epítipo, hay sólo dos sustituciones entre mAb806 y mAb175 (Figura 65). Los residuos de contacto de mAb175 son: cadena ligera S30, S31, N32, Y49, H50, Y91, F94,

W96 y cadena pesada D32, Y33, A34, Y51, S53, Y54, S55, N57, R59, A99, G100, R101; los residuos de contacto de mAb806 son los mismos, con diferencias en la secuencia de la cadena ligera, N30 y de la cadena pesada, F33. EGFR₂₈₇₋₃₀₂ se une a Fab través de estrechos contactos entre los residuos de péptido 293-302, estando la mayoría de los contactos entre los residuos 297 y 302. Los únicos enlaces de hidrógeno entre átomos de la cadena principal de EGFR₂₈₇₋₃₀₂ y Fab son para los residuos 300 y 302 (Figura 69F). El reconocimiento de la secuencia de epítipo se produce a través de los enlaces de hidrógeno de la cadena lateral a los residuos E293 (a H50 y R101 de Fab), D297 (a Y51 y N57), R300 (a D32) y K301 (a través de moléculas de agua a Y51 y W96). Los contactos hidrófobos se realizan en G298, V299 y C302.

[0538] La conformación del esqueleto del epítipo entre 293 y 302 era esencialmente idéntico en los cristales de Fab806 y Fab175 (rms desviación = 0,4 Å, para átomos C α en estos residuos). Aunque limitado por el enlace disulfuro, el extremo N-terminal del péptido (287-292) no hace un contacto significativo en ninguna estructura del anticuerpo y las conformaciones en esta región difieren. Sin embargo, este segmento en el complejo Fab806 parece bastante desordenado. De forma más interesante, la conformación del péptido EGFR₂₈₇₋₃₀₂ en contacto con los anticuerpos está muy estrechamente relacionada con la conformación de EGFR₂₈₇₋₃₀₂ observada en el esqueleto de las estructuras de EGFR inmovilizadas o no inmovilizadas (Li et al., 2005; Garrett et al., 2002). Para EGFR₂₈₇₋₃₀₂ del complejo Fab175, las desviaciones rms en posiciones C α son 0,66 y 0,75 Å, respectivamente (Figura 69).

[0539] Para obtener una mayor comprensión en el reconocimiento de EGFR por mAb806 y mAb175, se estudió la conformación del péptido EGFR₂₈₇₋₃₀₂ oxidado marcado con ¹⁵N por espectroscopía de RMN en solución, libre y en presencia de 806 Fab (ver Materiales y métodos). Para el péptido libre, se asignaron las resonancias y se compararon con las de conformación al azar. Esencialmente, el péptido libre adoptó una estructura de conformación aleatoria, no la cinta beta observada en el EGFR nativo (Garrett et al (2002) Cell 20; 110, 763-773).

[0540] Tras la adición de Fab, se observaron desplazamientos de resonancia. Sin embargo, debido a la débil señal que surge del ensanchamiento significativo de la línea tras la adición del Fab y la cristalización exitosa de los complejos, la estructura en solución del complejo Fab806-epítipo no se prosiguió. Claramente, sin embargo, cuando el péptido se une al fragmento Fab de mAb806 (o mAb175) parece que el Fab selecciona o induce la conformación del péptido que coincide con el péptido en el receptor nativo.

[0541] Con el fin de estudiar por qué mAb806 y mAb175 reconocen sólo algunas conformaciones de EGFR, el fragmento Fab de mAb175 se acopló en un dominio extracelular del EGFR (monómeros unidos o no unidos) mediante la superposición de EGFR₂₈₇₋₃₀₂. Para un fragmento del tipo Δ 2-7 no hubo colisiones estéricas significativas con el receptor. En la forma no unida hubo sustancialmente más área superficial accesible de la Fab enterrada (920 Å² en comparación con 550 Å² en forma unida). Por lo tanto, este antígeno puede realizar contactos adicionales con regiones no CDR del anticuerpo, tal como se ha indicado por los mutantes de expresión de levadura (Chao et al. (2004) J. Mol. Biol. 342, 539-550). A la inversa, acoplando todo el ectodominio de EGFR en el Fab, hay una solapamiento espacial sustancial con la parte del dominio CR1 anterior al epítipo (residuos 187-286) y que atraviesa el centro de Fab (Figura 69D y 69E). Por lo tanto, como el dominio CR1 tiene esencialmente la misma estructura en conformaciones unidas o sin unir, mAb806 o mAb175 serán incapaces de unirse a cualquiera de las formas de EGFR. Claramente, debe haber una diferencia entre la orientación del epítipo con respecto al dominio CR1 en cualquiera de conformaciones conocidas del wtEGFR y la orientación que permite la unión a epítipo. La inspección del dominio CR1 indicó que el enlace disulfuro (271-283) que precede a EGFR₂₈₇₋₃₀₂ limita el polipéptido que bloquea el acceso al epítipo; la alteración de este disulfuro, a pesar de que no está implicado en la unión directa a los anticuerpos, sería de esperar que permitiera el desplegamiento parcial del dominio CR1 para que mAb175 o mAb806 pudieran conseguir el acceso al epítipo.

Ruptura del enlace disulfuro de EGFR 271-283 aumenta la unión de mAb806

[0542] Los enlaces disulfuro en las proteínas proporcionan una mayor rigidez estructural, pero en algunos receptores de la superficie celular, en particular los de citoquinas y factores de crecimiento, la ruptura transitoria de enlaces disulfuro y de intercambio de disulfuro puede controlar la función del receptor (Hogg, PJ (2003) Trends in biochemical sciences 28, 210-214). Como se trataba de un mecanismo por el cual mAb806 y mAb175 podrían obtener el acceso a su sitio de unión, el aumento de la accesibilidad del epítipo se intentó mediante la mutación de uno o ambos de los residuos de cisteína en las posiciones 271 y 283 a residuos de alanina (C271A/C283A). Los vectores capaces de expresar C271A-EGFR, C283A-EGFR o C271A/C283A-EGFR de longitud completa se transfectaron en la línea celular Ba/F3 dependiente de IL-3. Se seleccionaron los clones de Ba/F3 estables, que expresan los mutantes C271A-EGFR y C271A/C283A-EGFR a niveles equivalentes al wtEGFR (Figura 70A). No se observaron células Ba/F3 que expresan altos niveles del mutante C283A-EGFR. Como se ha descrito anteriormente, el wtEGFR reacciona poco con mAb806; sin embargo, los receptores mutantes reaccionaron igualmente fuertemente con mAb528, mAb806 y el anticuerpo anti-FLAG, lo que sugiere que el receptor se expresa en la superficie celular, se pliega correctamente y que el epítipo para mAb806 es completamente accesible en tales casos. Para confirmar que mAb806 reconoce el mutante C271A/C283A de manera más eficiente que el wtEGFR, se determinó la relación de unión de mAb806 unión con respecto a la unión de mAb528. Dado que el EGFR de tipo salvaje y C271A/C283A-EGFR se marcaron con FLAG en N-terminal, también se determinó la relación de la unión de mAb806 y mAb528 la unión al anticuerpo M2. Como se ha descrito anteriormente, mAb806 sólo reconoció una pequeña proporción del

total de wtEGFR expresado en la superficie de células Ba/F3 (la relación de unión mAb806/528 es 0.08) (tabla 8). En cambio, mAb806 reconoció prácticamente todo el mutante C271A/C283A-EGFR expresado en la superficie celular (una relación de unión de mAb806/528 de 1,01) (Figura 70A y la Tabla 8).

Tabla 8

5

Reactividad de mAb806 con células que expresan el EGFR de tipo salvaje o C271A/C283A			
Línea celular	Relaciones de unión de anticuerpo		
	mAb 528/M2	mAb806/M2	mAb806/mAb 528
wtEGFR-FLAG	1,37	0,11	0,08
Wt-EGFR	-	-	0,07
C271/283*	1,08 ± 0,10	1,09 ± 0,38	1,01 ± 0,13

*Promedio para cuatro clones independientes

10

15

[0543] La mutación de las dos cisteínas no comprometía la unión de EGF o la función del receptor. Las células BaF3 que expresan el mutante C271A/C283A EGFR proliferan en presencia de EGF (Figura 70B). Se observó de manera reproducible un desplazamiento a la izquierda de la curva dosis-respuesta para EGF en células que expresan las mutaciones C271A/C283A, lo que sugiere una mayor afinidad por el ligando, o una potencial señalización mejorada para el receptor mutante. El análisis de transferencia de Western confirmó que el mutante C271A/C283A se expresa en niveles similares a la wtEGFR y se fosforila la tirosina en respuesta a la estimulación de EGF (Figura 70C). En concordancia con estudios anteriores en otras líneas celulares, mAb806 no tiene ningún efecto sobre la proliferación inducida por EGF in vitro de células Ba/F3 que expresan el wtEGFR, mientras que el ligando que bloquea mAb528 inhibe completamente la proliferación inducida por EGF de estas células (Figura 70D, panel izquierdo). En cambio, mAb806 anuló totalmente la proliferación inducida por EGF en las células BaF3 que expresan el mutante C271A/C283A (Figura 70D, panel derecho). Cuando se altera el bucle de cisteínas 271-283, no sólo mAb806 se une de manera más eficaz, sino que una vez unido, mAb806 impide la proliferación inducida por ligando.

20

Tabla 9

Recogida de datos y estadística de refinamiento				
Recogida de datos				
	806 (nativo)	806 (péptido)	175 (nativo)	175 (péptido)
Dimensiones de celda del grupo espacial (Å)	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
A	140,37	35,92	36,37	83,17
B	74,62	83,16	94,80	69,26
C	83,87	72,21 β = 92,43	108,90	71,47
Fuente	interna	BNL X29	interna	Interna
Longitud de onda (Å)	1,542	1,1	1,542	1,542
Intervalo de resolución (Å)	29,7-2,2 (2,27-2,20)	50-2,0 (2,07-2,0)	50-2,8 (2,87-2,8)	14,18-1,59 (1,65-1,59)
R _{mezcla} (%)	6,4 (26,7)	6,6 (28,2)		8,6 (30,0)
I/σ	12,2 (3,2)	22 (3,15)		10,2 (2,2)
Completación (%)	98,3 (91,3)	96,6 (79,2)	98,4 (90,5)	78,8 (11,8) 98,1 a 1,89 Å
Reflejos totales	156497	98374		205401
Reflejos únicos	44905	27692	9171	43879
Refinamiento				
Intervalo de resolución (Å)				
Reflejos	20-2,3	72,17-2,00	50-2,6	14,18-1,6
R _{cris}	37397	26284	9171	41611
R _{libre}	0,225	0,226	0,210	0,203
Átomos de proteína	6580	3294	3276	3390
Átomos de disolvente	208	199	46	247
Longitud de enlace r.m.s.d. (Å)	0,022	0,007	0,015	0,014
Longitud de enlace r.m.s.d. (°)	1,70	1,12	1,77	1,48

Factor B promedio (\AA^2)	40,3	33,6	37,5	20,7
Factores B anisotrópicos globales (\AA^2)B11	-1,52	2,42	0,20	1,13

Discusión

5 [0544] Los estudios estructurales con el epítipo EGFR₂₈₇₋₃₀₂ muestran que tanto mAb806 como mAb175 reconocieron el mismo motivo estructural 3D en las estructuras wtEGFR, lo que indica que esta conformación del esqueleto también se produce en y se expone en el $\Delta 2$ -7EGFR. Fundamentalmente, sin embargo, la orientación del epítipo en estas estructuras impediría el acceso del anticuerpo a los aminoácidos pertinentes. Esto es consistente con la observación experimental de que mAb806 no se une a wtEGFR expresado en la superficie celular a niveles fisiológicos.

10 [0545] Los resultados con el mutante EGFR_{C271A/C283A} indican que el dominio CR1 puede abrirse para permitir que mAb806 y mAb175 se unan estequiométricamente a este receptor mutante. Este receptor mutante todavía puede adoptar una conformación nativa, ya que es totalmente sensible a la estimulación de EGF, pero, a diferencia del wtEGFR, está completamente inhibida por mAb806. Si existiera una forma mal plegada del EGFR con este enlace disulfuro roto en la superficie de las células cancerosas, los datos muestran claramente que sería capaz de iniciar la señalización celular y debe ser inhibida por cualquiera de mAb806 o mAb175.

15 [0546] Otra explicación de los datos es que durante la activación de ligando, la reorganización estructural del receptor podría inducir el desplegamiento local en las proximidades del epítipo, permitiendo que el receptor adopte una conformación que permite la unión. En las estructuras de cristal, el epítipo se encuentra cerca del centro físico del ectodominio de EGFR y el acceso al epítipo está bloqueado por el dominio CR1 plegado y la estructura cuaternaria del ectodominio de EGFR. En las conformaciones unidas y no unidas, la integridad del dominio CR1 se estabiliza mediante interacciones adicionales, ya sea con ligando L1:dominios L2 (no unido) o dominios L2:CR2 (unido). Sin embargo, la región del epítipo tiene algunos de los parámetros térmicos más altos encontrados en el ectodominio: el epítipo de mAb806/175 es estructuralmente lábil. Durante la activación del receptor, cuando el receptor experimenta una transición entre las conformaciones unida y no unida, mAb806 y mAb175 pueden acceder al epítipo. Por lo tanto a nivel molecular, estos mecanismos podrían contribuir a la insignificante unión de mAb806 y mAb175 a las células normales y los niveles sustancialmente más altos de unión a las células tumorales que tienen EGFR sobreexpresado y/o activado.

30 Ejemplo 24

Anticuerpos monoclonales 124 y 1133

35 [0547] Como se ha expuesto en el Ejemplo 1 anterior, mAb124 y mAb1133 se generaron al mismo tiempo que mAb806 y se encontró que muestran propiedades similares, en particular, la especificidad para el EGFR de tipo salvaje sobreexpresado, a las propiedades únicas de mAb806 discutidas en el presente documento.

40 [0548] Se llevaron a cabo cribados iniciales en Nueva York (Jungbluth et al. (2003) A monoclonal Antibody Recognizing Human Cancers with Amplification/Over-EXpression of the Human Epidermal Growth Factor Receptor PNAS. 100, 639-644. Las evaluaciones de competición en ELISA y los análisis de Biacore se llevaron a cabo para determinar si mAb124 y/o mAb1133 reconocen un epítipo idéntico al mAb806 o un determinante de EGFR alternativo.

45 Análisis FACS

[0549] La unión del anticuerpo a células U87MG. $\Delta 2$ -7, A431 y HN5 se evaluó por FACS. Todos los anticuerpos mostraron una especificidad similar a la de mAb806 con fuerte unión al EGFR de 2-7 y una unión de baja al EGFR de tipo salvaje sobreexpresado.

50 ELISA de competición

55 [0550] Se realizaron una serie de pruebas ELISA de competición para determinar si los anticuerpos 124 y 1133 competían con el epítipo de mAb806. Brevemente, el dominio soluble desnaturado del EGFR (sEGFR) recubrió placas de ELISA. Anticuerpos 124 o 1133 no marcados se añadieron a continuación a través de la placa en concentraciones crecientes. Después del lavado, se añadió mAb806 biotinilado a cada pocillo para determinar si todavía podría unirse al sEGFR. La detección de mAb806 unido se consiguió utilizando HRP conjugada a estreptavidina. Si un anticuerpo se une al mismo epítipo (o se solapa), entonces no se espera la unión de mAb806.

[0551] Los resultados se resumen en la Tabla 10. Se observó un efecto de unión inhibitor dependiente de la concentración para mAb124 y mAb113: la unión a mAb806 aumentó a medida que la concentración de anticuerpo no marcado disminuyó, lo que sugiere que los anticuerpos 124 y 1133 reconocen un epítipo idéntico a mAb806 o uno muy próximo.

5

Tabla 10

Resumen de la unión en ELISA de competición de mAb124 y mAb1133 a sEGFR	
Anticuerpo bloqueante no marcado	Unión de 806 marcado con biotina
124	Ninguna
1133	Ninguna
806 (control para la inhibición)	Ninguna
IgG2b irrelevante	++++

Análisis FACS: Competición de unión celular

10 [0552] Se preincubaron células U87MG.Δ2-7 con anticuerpo no marcado 124, 1133. Se incluyeron en el ensayo el control positivo 806 y el control de isotipo. Las células se lavaron, a continuación, se tiñeron con mAb806 conjugado a Alexa488 y se determinó el nivel de unión de 806 mediante FACS.

15 [0553] Los resultados se resumen en la Tabla 11. Los anticuerpos 124 y 1133 bloquearon la unión de mAb806 a la superficie celular indicando el reconocimiento de un epítipo idéntico a mAb806 o uno muy próximo.

Tabla 11

Análisis FACS: Competición de la unión a células U87MG.Δ2-7	
Anticuerpo bloqueante no marcado	Inhibición de 806 marcado con Alexa488
124	+++
1133	+++
806	++++
IgG2b control	Ninguna

Análisis BIAcore: Unión al epítipo de péptido mAb806

20 [0554] Se sintetizó la secuencia de aminoácidos de EGFR₂₈₇CGADSYEMEEDGVRKC₃₀₂ (SEQ ID NO: 14) que contenía el epítipo mAb806 como un péptido y se inmovilizó sobre el chip biosensor. Se midió unión de los anticuerpos 124, 1133 y 806 (200 nM) a este péptido. Las unidades de resonancia de unión máxima (RU) obtenidos se resumen en la Tabla 12. El 124, 1133 mostraron una unión clara al péptido confirmando el reconocimiento del epítipo de péptido 806.

25

Tabla 12

Análisis BIAcore: Unión máxima al epítipo de péptido mAb806	
Anticuerpo	Unión al péptido mAb806 (RU)
806	1100
124	1000
1133	800

30

Discusión

35 [0555] Como se muestra en este ejemplo, mAb124 y mAb1133 se unen al péptido de EGFR reconocido por mAb806 y bloquean la unión de mAb806 al dominio extracelular de EGFR y las células que expresan el EGFR de2-7. Por lo tanto, estos tres anticuerpos reconocen el mismo determinante en EGFR.

Ejemplo 25

Pruebas Clínicas de ch806

40

[0556] Se diseñó un estudio clínico para examinar la especificidad in-vivo de ch806 en un análisis de reconocimiento/biodistribución/farmacocinética del tumor en pacientes con diversos tipos de tumores.

1. Materiales y Métodos

45

Diseño del ensayo

[0557] Este primer ensayo en hombres fue un estudio de fase I de marcaje abierto y escalado a la dosis. El objetivo principal fue evaluar la seguridad de una sola infusión de ch806 en pacientes con tumores avanzados que expresan el antígeno 806. Los objetivos secundarios del estudio fueron determinar la biodistribución, la farmacocinética y la captación por el tumor de ¹¹¹In-ch806; determinar la respuesta inmune del paciente a ch806; y evaluar la evidencia temprana de la actividad clínica de ch806. Se eligió una sola dosis para este estudio con el fin de evaluar de manera óptima la especificidad in-vivo de ch806 para EGFR expresado en tumor. El protocolo fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética Humana del Hospital de Austin antes de comenzar el estudio. El ensayo se llevó a cabo bajo el esquema Australian Therapeutic Goods Administration Clinical Trials Exemption (CTX). Todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito.

[0558] Los criterios de elegibilidad incluyeron: tumores avanzados o metastásicos positivos para la expresión del antígeno 806 basados en hibridación in situ cromogénica o inmunohistoquímica de muestras tumorales almacenadas (los tumores fueron definidos como positivos en 806 si la evaluación inmunohistoquímica de las muestras tumorales almacenadas mostraban alguna célula positiva para la expresión de 806, ver abajo); tumor maligno histológico o citológicamente probado; enfermedad medible en TC con al menos una lesión ≥ 2 cm; la supervivencia esperada de al menos 3 meses; escala funcional de Karnofsky (KPS) ≥ 70 ; función hematológica, hepática y renal adecuada; edad > 18 años; y capaz de dar su consentimiento informado. Los criterios de exclusión fueron: metástasis en el sistema nervioso central activo (a menos de ser tratada adecuadamente y estable); quimioterapia, inmunoterapia, terapia biológica, o radioterapia en las cuatro semanas anteriores al ingreso al estudio; la exposición anterior a anticuerpos [a menos que no haya pruebas de anticuerpos antiquméricos humanos (HACA)]; fracaso para recuperarse plenamente de los efectos de la terapia previa de cáncer; uso concurrente de corticosteroides sistémicos o agentes inmunosupresores; infección no controlada u otra enfermedad grave; embarazo o la lactancia; las mujeres en edad fértil que no utilicen medios médicamente aceptables de anticoncepción.

[0559] Los pacientes recibieron una sola infusión de la traza de ch806 marcado con indio-111 (¹¹¹In, 200-280 MBq; 5-7 mCi) mediante infusión intravenosa en solución salina normal/albúmina de suero humano al 5% durante 60 minutos. El escalado de la dosis planeada significaba que los pacientes fueron incluidos en uno de cuatro niveles de dosis: 5, 10, 20 y 40 mg/m². Estas dosis fueron elegidas para permitir la evaluación de la especificidad de ch806 a EGFR expresado en tumores, y para determinar si cualquier compartimiento de tejido normal se une a ch806 (y afecta a la farmacocinética o biodistribución) en vivo. La biodistribución, farmacocinética, y la respuesta inmune se evaluaron en todos los pacientes.

[0560] La formación de imágenes por cámara gamma de todo el cuerpo para la evaluación de la biodistribución y la captación por el tumor se realizó en el Día 0, Día 1, Día 2 ó 3, Día 4 ó 5, y el Día 6 ó 7 después de la infusión con ¹¹¹In-ch806. Las muestras de sangre para farmacocinética se obtuvieron en estos puntos de tiempo, y adicionalmente en el Día 14 (± 2 días) y el Día 21 (± 2 días). Las muestras de sangre para la evaluación de los niveles de HACA se obtuvieron en la línea base, y semanalmente hasta el día 30. La evaluación de la toxicidad se realizó en cada visita del estudio. El examen físico y hematología y bioquímica de rutina se realizaron semanalmente hasta el final del estudio (día 30). La reestadificación se realizó el día 30.

Criterios de escalada de dosis

[0561] Se observó el primer paciente en cada nivel de dosis durante cuatro semanas antes de la inscripción de cualquier paciente adicional. Si no se observó toxicidad limitante de dosis (DLT) en ninguno de los 2 primeros pacientes dentro de las 4 semanas de la infusión de ch806, 4 pacientes fueron a continuación introducidos en el nivel de dosis inmediatamente superior. Si un paciente en cualquier cohorte de 2 pacientes experimentó DLT en 4 semanas desde la primera dosis, se introdujeron 4 pacientes adicionales (máximo de 6) se introdujeron en ese nivel de dosificación. Si no más de un paciente de 6 en cualquier nivel de dosis experimentó \geq toxicidad de grado 3, los pacientes posteriores se introdujeron en el siguiente nivel de dosis.

[0562] DLT se definió como toxicidad no hematológica de grado 3 o toxicidad hematológica de grado 4 según la definición de los criterios de Terminología Común para Eventos Adversos de NCI (CTCAE v3.0). La dosis máxima tolerada (MTD) se definió como la dosis de ch806 por debajo de la que 2 o más pacientes de 6 experimentaron DLT.

Marcaje radioactivo de ch806

[0563] Se produjo ch806 de grado clínico en la Instalación para la Producción Biológica del Instituto Ludwig para la Investigación del Cáncer, Melbourne (Ludwig Institute for Cancer Research), Australia. El anticuerpo ch806 se marcó con ¹¹¹In (MDS Nordion, Kanata, Canadá) a través del quelato de ion metálico bifuncional CHX-A"-DTPA de acuerdo con los métodos descritos previamente (Scott et al. (2000) Cancer Res 60, 3254- 3261; Scott et al (2001) J. Clin Oncol 19 (19), 3.976-3.987).

Obtención de imágenes por cámara gamma

[0564] Se obtuvieron imágenes de cuerpo entero de biodistribución de ^{111}In -ch806 en todos los pacientes en el día 0 después de la infusión de ^{111}In -ch806, y en al menos 3 ocasiones más hasta el día 7 después de la infusión. También se obtuvieron imágenes de tomografía computerizada de emisión monofotónica (SPECT) de una región del cuerpo con tumor conocido en al menos una ocasión durante este período. Todas las imágenes de la cámara gamma se obtuvieron en una cámara gamma de doble cabezal (Picker International, Cleveland, OH).

Farmacocinética

[0565] La sangre para el análisis farmacocinético se recogió en el Día 0 – antes de la infusión de ^{111}In -ch806; a continuación, a los 5 minutos, 60 minutos, 2 h y 4 h y después de la infusión de ^{111}In -ch806, Día 1, Día 2 o 3, Día 4 o 5, y el Día 6 o 7. Se obtuvo sangre adicional para farmacocinética de la proteína ch806 en el Día 14 (± 2 días) y el Día 21 (± 2 días) y el Día 30 (± 2 días).

[0566] Las muestras de suero se tomaron en alícuotas por duplicado y se contaron en un contador de centelleo gamma (Packard Instruments, Melbourne, Australia), junto con patrones de ^{111}In apropiados. Los resultados del suero se expresaron como % de dosis inyectada por litro (% ID/l). La medición de los niveles de proteína ch806 en suero de paciente después de cada infusión se realizó usando un protocolo validado para la medición inmunoquímica de la proteína ch806 en suero humano⁴⁰. El límite de cuantificación para ch806 en muestras de suero fue de 70 ng/ml. Todas las muestras se ensayaron por triplicado y se diluyeron por un factor de al menos 1:2. Los niveles séricos medidos de ch806 se expresaron como ug/ml.

[0567] Los cálculos farmacocinéticos se realizaron en mediciones de ^{111}In -ch806 en suero después de la infusión, y el ELISA determinó los niveles de proteína ch806 en suero de paciente, utilizando un programa de ajuste de curvas (WinNonlin Pro 5.0.1 Nodo, Pharsight Co., Mountain View, CA). Las estimaciones fueron determinadas por los siguientes parámetros: $T_{1/2\alpha}$ y $T_{1/2\beta}$ (semimedia de las fases inicial y terminal de disposición); V1, volumen de compartimiento central; Cmax (concentración máxima en suero); AUC (área bajo la curva de concentración sérica extrapolada a tiempo infinito); y CL (depuración sérica total).

Dosimetría de depuración de todo el cuerpo y para tumor y órganos de ^{111}In -ch806

[0568] Los cálculos de dosimetría de todo el cuerpo y órgano normal (hígado, pulmones, riñones y bazo) se realizaron basados en las regiones de interés en cada grupo de datos de imágenes por infusión de ^{111}In -ch806 a cada paciente individual, lo que permite el cálculo de la actividad acumulada y el análisis utilizando OLINDA para los resultados finales de dosimetría (Stabin et al., (2005) J. Nucl. Med. 46 (6), 1023-1027). Las regiones de interés también se definieron para los tumores adecuados en cada punto de tiempo en grupos de datos de imágenes con ^{111}In -ch806, corregidos por el fondo y la atenuación, y el cálculo de la dosimetría se realizó para derivar la concentración de ^{111}In -ch806 en tumor/g (Scott et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11 (13), 4.810-4.817). Esto se convirtió en ug ch806/g tejido tumoral basado en la dosis de proteína ch806 en mg inyectada.

Análisis de HACA

[0569] Las muestras de sangre para la evaluación HACA fueron tomadas antes de la infusión con ch806, a continuación semanalmente hasta 30 días después de la infusión con ch806. Las muestras se analizaron por ELISA, y mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial usando un instrumento BIAcore2000, tal como se ha descrito previamente (Scott et al, 2005;.. Liu et al (2003) Hybrid Hybridomics 22 (4), 219-28; Ritter et al. (2001) Cancer Res. 61 (18), 685-6859).

Método de inmunohistoquímica

[0570] Se inmunotizó tejido tumoral fijado en formalina y embebido en parafina de cada paciente en la prueba de la siguiente manera: brevemente, se montaron secciones de 4 μm de tejido embebido en parafina en portaobjetos SuperFrost® Plus (Menzel-Glaser, Alemania), se desparafinizaron y rehidrataron antes de la recuperación de antígeno por microondas en Solución de recuperación objetivo, pH 6,0 (10 min; Dako, Glostrup, Dinamarca). Las secciones se trataron entonces con H_2O_2 al 3% durante 10 min para eliminar la peroxidasa endógena y se incubaron a temperatura ambiente durante 60 min con el anticuerpo m806 (4 ug/ml) o con la concentración adecuada de anticuerpo de control del mismo isotopo negativo; (IgG2b Chemicon, Temecula, CA). La unión del anticuerpo se detectó usando el Kit PowerVision (ImmunoVision Technologies, Brisbane, CA) Para permitir la visualización de la inmunotinción, las secciones se incubaron con el cromógeno 3-amino-9-etilcarbazol (0,4%, Sigma Chemical Co. MO, EE.UU.) durante 10 min y se contratiñeron con hematoxilina de Mayer. Los controles negativos para el procedimiento de inmunotinción fueron preparados por omisión del anticuerpo primario. Los resultados se expresaron como un porcentaje de tinción positiva de las células tumorales.

Método de hibridación in situ cromogénico

[0571] Se seccionó tejido tumoral fijado en formalina y embebido en parafina de cada paciente en la prueba y se montó en portaobjetos SuperFrost® Plus, se desparafinizó y rehidrató antes del pretratamiento con el kit de

pretratamiento de tejido SpotLight® (Zymed Laboratories Inc. South San Francisco, CA). Las secciones se cubrieron entonces con la sonda de ADN de EGFR SpotLight®, se desnaturalizaron a 95°C durante 10 min y se incubaron durante la noche a 37°C. Después de la hibridación, los portaobjetos se lavaron en 0,5 X SSC. La detección de la sonda se realizó utilizando el kit de detección de polímeros SpotLight® CISH™. Las secciones que mostraban grupos de señales o ≥ 5 señales individuales en $> 25\%$ de las células de cáncer se consideraron que tenían una amplificación del gen de EGFR que se correlacionaba con la reactividad M806.

2. Resultados

Pacientes

[0572] Ocho pacientes (1 mujer y 7 varones, con una edad promedio de 61 años (rango 44-75)) completaron el ensayo (tabla 16). Los sitios de tumor primario, el historial de terapia anterior, y los sitios de la enfermedad al inicio del estudio también se muestran en la Tabla 16. Los 8 pacientes tenían positividad de antígeno de 806 en tumores almacenados (tabla 16).

[0573] Todos los pacientes cumplieron los criterios de inclusión y, a excepción de paciente 8 (que tenía un tumor cerebral primario), todos tenían enfermedad metastásica al inicio del estudio. Los sitios de la enfermedad clasificados como lesiones diana incluían: pulmón (5 pacientes), cerebro (1 paciente), ganglios linfáticos (1 paciente), supraglotis (1 paciente). Otros sitios de enfermedad metastásica (lesiones no diana) incluían una masa suprarrenal, hueso y nódulos linfáticos (tabla 16). El estado funcional de Karnofsky mediana fue de 90 (rango 80 a 100).

Tabla 16

Características del paciente									
Pt No.	Nivel de dosis (mg/m ²)	Edad (años)	Sexo	KPS (%)	Sitio de tumor primario	IHC de células positivas (%)	Terapias previas	Sitios de enfermedad a la entrada del estudio	Respuesta del tumor a ch806
1	5	71	M	10	NSCLC	50-75	RT	Pulmón, adrenal	PD
8	5	44	M	90	Astrocitoma anaplásico	>75*	Cirugía, RT, CT	Cerebro	SD
2	10	49	F	80	SCC Ano	<10	Quimio, RT	LN, pulmón, hueso	SD
3	10	75	M	90	NSCLC	50-75	Cirugía RT	Pulmón	SD
4	20	52	M	100	Colon	<10†	Cirugía, CT	Pulmón, LN	PD
5	20	65	M	80	Mesotelioma	>75	RT, CT	Pulmón	SD
6	40	59	M	80	SCC cuerda vocal	>75	Cirugía, RT, CT	Tejido blando	SD
7	40	71	M	80	SCC piel	50-75	Cirugía, CT	Pulmón, LN	PD

Abreviaturas: F = hembra; M = macho; NSCLC = carcinoma de pulmón no microcítico; SCC = carcinoma de células escamosas; RT = radioterapia; CT = quimioterapia; LN = nódulos linfáticos; PD = enfermedad progresiva; SD = enfermedad estable * positivo para la expresión de de 2-EGFR † positivo para la amplificación del gen de EGFR

Eventos adversos y HACA

[0574] Los eventos adversos relacionados con ch806 se enumeran en las Tablas 17 y 18. No se observaron eventos adversos relacionados con la infusión. No hubo DLT, y por lo tanto no se alcanzó MTD. Las principales toxicidades que, en opinión del investigador, fueron posiblemente atribuible a ch806 fueron: prurito transitorio, náusea leve, fatiga/letargo, y los posibles efectos sobre los niveles séricos de ALP y GGT. Se observó una elevación de CTC de grado 2 en el nivel de GGT en el Paciente 5, sin embargo, esto fue sobre un fondo de una línea de base de elevación de grado 1, y era de naturaleza transitoria. Se describieron tres eventos adversos graves (SAE), pero ninguno se atribuyó a ch806. En general, ch806 fue seguro y bien tolerado en todas las dosis observándose toxicidades menores generalmente predecibles y manejables. No se realizó un escalado adicional de la dosis debido a la cantidad limitada de GMPc ch806 disponible para la prueba.

[0575] Se observó una respuesta inmune positiva a ch806 (con la concordancia de ambos métodos ELISA y BIAcore) en sólo uno de los ocho pacientes (paciente 1).

Tabla 17

Aparición de eventos adversos relacionados con ch806					
Evento adverso	Nivel de dosis (mg/m ²)*				Número total de episodios de cada evento
	5	10	20	40	
Mareos	0	0	0	1	1
Fatiga	0	0	1	0	1
Letargo	0	0	0	1	1
Supresión del apetito	0	0	0	1	1
Nausea	0	1	0	1	2
Pruritis	1	0	0	0	1
Nivel elevado de ALP	0	0	1	0	1
Nivel elevado de GGT	0	0	1	0	1
Total	1	1	3	4	9

*los números representan el número de episodios de cualquier evento a cualquier nivel de dosis

Tabla 18

5

Distribución de los eventos adversos relacionados con el agente de estudio				
Nivel de dosis (mg/m ²)	Toxicidad de grado CTC máxima*			
	1 = leve	2 = moderada	3 = grave	4 = mortal
5	1	0	0	0
10	1	0	0	0
20	2	1	0	0
40	4	0	0	0
Global	8	1	0	0

* Número de pacientes

Marcaje radioactivo de ch806

10 [0576] Hubo un total de 8 infusiones de ¹¹¹In-ch806 administradas durante la prueba. La pureza radioquímica promedio (± SD) y la inmunorreactividad de ¹¹¹In-ch806 se midió para que fuera 99,3 ± 0,1% y 77,4 ± 7,0%, respectivamente.

Biodistribución de ch806

15 [0577] El patrón inicial de biodistribución de ¹¹¹In-ch806 en los pacientes en todas las dosis fue consistente con la actividad de acumulación de sangre, que se depuró gradualmente con el tiempo. Durante el periodo de una semana después de la inyección la captación de ¹¹¹In-ch806 en el hígado y el bazo era consistente con la depuración normal de metabolitos ¹¹¹In-quelatos a través del sistema reticuloendotelial. Se observó localización específica de ¹¹¹In-ch806 en lesiones diana (≥ 2 cm) de todos los pacientes en todos los niveles de dosis (Figura 94), incluyendo lesiones diana localizadas en los pulmones (pacientes 1, 3, 4, 5, y 7), el abdomen (pacientes 1 y 2), y la región supraglótica en el lado derecho del cuello (paciente 6). También se demostró la alta captación de ¹¹¹In-ch806 en un tumor cerebral (paciente 8) (figura 95). Es importante destacar que la captación de ¹¹¹In-ch806 en el tumor no era dependiente de un nivel de expresión de antígeno de 806. Por ejemplo, el paciente 4 mostró una alta captación por ambas lesiones diana de pulmón, a pesar de <10% de positividad por IHC para reactividad de 806 en tumores almacenados (Figura 96). Este grado de captación de ¹¹¹In-ch806 en lesiones diana en el paciente 4 fue comparable al observado en el paciente 3, donde el 50-75% de las células tumorales fueron positivas para la tinción de antígeno de 806 en inmunohistoquímica de muestra almacenada (Figura 96).

Farmacocinética

30 [0578] Los parámetros farmacocinéticos de pacientes individuales T_{1/2}α, T_{1/2}β, V1, Cmax, AUC y CL para una sola infusión de ¹¹¹In-ch806 se muestran en la Tabla 19. La prueba de suma de rangos de Kruskal-Wallis se aplicó a las semividas alfa y beta, V1 y depuración. No se observó ninguna diferencia significativa entre los niveles de dosis (P> 0,05).

35 [0579] La curva farmacocinética ajustada a los datos ELISA de la población agrupada se muestra en la Figura 97. Los parámetros farmacocinéticos en promedio ± SD fueron T_{1/2}α 29,16 ± 21,12 h, T_{1/2}β 172,40 ± 90,85 h, V1 2.984,59 ± 91,91 ml, y CL 19,44 ± 4,05 ml/h. Los datos de concentraciones en suero de ch806 máxima y mínima

(Cmax y Cmin) se presentan en la Tabla 20 para cada paciente. Como era de esperar, se observaron relaciones lineales para Cmax y Cmin con cada dosis. Los valores promedio ± SD determinados para los datos farmacocinéticos de ELISA de ch806 se encontraban en concordancia con los valores obtenidos para los datos farmacocinéticos de ¹¹¹In-ch806 (Tabla 19).

5

Tabla 19

Estimaciones del parámetro farmacocinético (promedio ± SD) para ¹¹¹ In-CHX-A''-DTPA-ch806 en cada nivel de dosis y a lo largo de todos los niveles de dosis										
Nivel de dosis (mg/m ²)	T _{1/2} α (h)		T _{1/2} β (h)		V1 (ml)		CL (ml/h)		AUC (h*mg/ml)	
	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
5	10,91	3,4	183,9	110,2	2963,06	493,23	21,97	16,59	541,17	371,75
10	11,75	4,4	124,5	9,25	3060,29	721,70	28,58	8,60	566,79	26,39
20	9,34	8,3	125,3	73,66	2902,06	1064,77	30,98	21,65	1438,12	957,18
40	8,95	3,2	133,9	10,79	4742,42	169,10	37,99	6,47	2269,04	381,68
TODOS	10,24	1,32	141,90	28,30	3416,96	886,04	29,88	6,61		

Tabla 20

10

Cmax y Cmin de los niveles de ch806 en suerp determinadas mediante un análisis ELISA			
PT No.	NIVEL DE DOSIS (MG/M ²)	Cmax* (uG/ML)	Cmin* (uG/ML)
1	5	1,38 ± 0,02	0,10 ± 0,05†
8	5	1,52 ± 0,17	0,96 ± 0,08
2	10	5,92 ± 0,11	1,50 ± 0,01
3	10	6,27 ± 0,45	1,83 ± 0,20
4	20	12,25 ± 0,66	4,05 ± 0,05
5	20	11,22 ± 0,77	1,58 ± 0,04
6	40	27,76 ± 2,10	6,90 ± 0,38
7	40	32,32 ± 0,84	6,80 ± 0,13

* Cmax = 60 min después de la inyección; Cmin = nivel de suero día 7 † día 8

Dosimetría de ¹¹¹In-ch806

15 **[0580]** La depuración corporal total fue similar en todos los pacientes a todos los niveles de dosis, con una T_{1/2} biológica (promedio ± SD) de 948,6 ± 378,6 horas. Debido a la semivida física relativamente corta, el cálculo de la semivida biológica era extremadamente sensible a pequeños cambios en la semivida eficaz. No hubo diferencia estadísticamente significativa en la depuración corporal total entre los niveles de dosis [prueba de suma de rangos Kruskal-Wallis: valor P = 0,54] (Figura 98).

20 **[0581]** La depuración de ¹¹¹In-ch806 de órganos normales (hígado, pulmones, riñón y bazo) no mostró diferencias entre los niveles de dosis, y la T_{1/2} eficaz promedio se calculó que era 78,3, 48,6, 69,7 y 66,2 horas, respectivamente. No hubo diferencia estadísticamente significativa en la depuración entre estos órganos normales. En particular, la depuración del hígado no mostró diferencias entre los niveles de dosis (Figura 98), indicando que no hay un compartimiento de antígeno saturable en el hígado para ch806.

25 **[0582]** Se completó el análisis dosimetría del tumor para 6 pacientes. Los pacientes 1 y 2 tenían lesiones diana cerca del acumulación de sangre cardiaca, o movimiento durante algunas adquisiciones de imagen, lo que impidió un análisis preciso. La captación máxima medida de ¹¹¹In-ch806 tuvo lugar 5-7 días después de la infusión, y varió desde 5,2 hasta 13,7 x 10⁻³ % de dosis inyectada/g de tejido tumoral.

30

Evaluación de la actividad clínica

35 **[0583]** Al finalizar este período de estudio de un mes se observó que 5 pacientes tenían una enfermedad estable, y 3 pacientes una enfermedad progresiva (tabla 16). Curiosamente, un paciente (paciente 7, nivel de dosis 40 mg/m²) presentaba evidencias clínicas de la contracción transitoria de un ganglio linfático auricular palpable (que demostró ser SCC metastásico en la aspiración con aguja fina) durante el período de estudio, lo que sugiere una posible actividad biológica de ch806. Sin embargo, este paciente había confirmado una enfermedad progresiva mediante RECIST al finalizar el estudio.

40 Datos Adicionales

[0584] Ocho pacientes [1 hembra y 7 varones; edad promedio de 61 años (rango 44-75)] completaron esta prueba de fase 1 según se ha descrito (Scott et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 4071-4076). Todos los pacientes

cumplieron los criterios de inclusión y, a excepción de Paciente 8 (que tenía un tumor cerebral primario), todos tenían enfermedad metastásica en el momento del ingreso al estudio. La captación de Ab por el tumor se observó en todos los pacientes, y ^{111}In ch806, la versión quimerizada de mAb806, demostró una rápida y de nivel elevado en el tumor (Figura 71). La depuración de ^{111}In -ch806 de órganos normales (hígado, pulmones, riñón y bazo) no mostró diferencias entre los niveles de dosis (Scott et al., 2007). En particular, la depuración del hígado no mostró diferencias entre los niveles de dosis, indicando que no hay un compartimiento de antígeno saturable en el hígado para ch806. La captación total en el hígado fue de un máximo de $14,45 \pm 2,43\%$ ID inmediatamente después de la infusión, y disminuyó a $8,45 \pm 1,63\%$ ID a las 72 horas, y $3,18 \pm 0,87\%$ ID antes de una semana después de la infusión. Esto está en marcado contraste con la captación de anticuerpos para wtEGFR (por ejemplo, 225), que se ha observado que llega a más del 30% ID en el hígado (para una dosis de 40 mg) durante 3 días después de la infusión (Divgi et al. (1991) J. Natl. Cancer Inst. 83, 97-104). La captación tumoral máxima medida de ^{111}In -ch806 tuvo lugar 5-7 días después de la infusión. El cálculo de captación tumoral cuantitativa en pacientes 1 y 3 no se pudo realizar con precisión debido a la proximidad de la lesión diana a la acumulación de sangre cardíaca y el movimiento del paciente. La captación de ch806 máxima en el tumor varió de $5,21$ a $13,73 \times 10^{-3} \% \text{ID}$ tejido tumoral/g. El cálculo de la concentración real de ch806 en el tumor mostró valores máximos de (promedio \pm SD) $0,85 \pm 0$ ug/g (5 mg/m^2), $0,92 \pm 0$ ug/g (10 mg/m^2), $3,80 \pm 1,10$ ug/g (20 mg/m^2), y $7,05 \pm 1,40$ ug/g (40 mg/m^2).

Discusión

[0585] Tal como se establece en este ejemplo, este estudio representa la primera demostración descrita de la biodistribución y reconocimiento de tumor de un anticuerpo quimérico contra un epítipo solamente expuesto en formas sobreexpresadas, mutantes o activadas por ligando del EGFR. Ch806 mostró un excelente reconocimiento de los sitios de tumor en todos los pacientes, sin evidencia de captación del tejido normal, y sin toxicidad significativa. Estas características in vitro e in vivo de ch806 lo distinguen de todos los otros anticuerpos que reconocen EGFR.

[0586] En dosis de hasta 40 mg/m^2 , el ch806 fue bien tolerado, no se observó DLT y no se alcanzó MTD. Las principales toxicidades que eran posiblemente atribuibles a ch806 fueron prurito transitorio, náusea leve, fatiga/letargo y posibles efectos sobre los niveles séricos de ALP y GGT. La naturaleza avanzada de los tumores malignos de estos pacientes significaba que su enfermedad también podría haber sido un factor de contribución a estos eventos adversos. De los eventos adversos que se relacionaron posiblemente con el fármaco en estudio, todos eran leves, muchos fueron autolimitantes, y ninguno requiere ningún tratamiento activo. Es importante destacar que no se observaron erupción de la piel o trastornos del tracto gastrointestinal en ningún paciente, incluso en el nivel de dosis más alto. La excelente tolerabilidad de ch806 en este estudio de dosis única justifica el siguiente paso de la prueba en ensayos de dosis repetitivas.

[0587] La biodistribución de ch806 en todos los pacientes mostró una depuración gradual de la actividad de acumulación de sangre, y una captación por tejido normal no definida de ^{111}In -ch806. También fue evidente una excelente captación tumoral de ch806 en todos los pacientes, incluyendo metástasis de los pulmones, los ganglios linfáticos y suprarrenales y en el mesotelioma y glioma. Esto se observó en todos los niveles de dosis que incluyen 5 mg/m^2 (la dosis más baja estudiada), que es de un décimo a una vigésima parte de la dosis requerida para visualizar la captación en el tumor por otros anticuerpos para wtEGFR³³. Esta diferencia en la captación de ch806 en comparación con anticuerpos para wtEGFR se puede atribuir a su captación por tejido normal sustancial (hígado y piel) debido a la acción de wtEGFR como disipador de antígeno³³. Además, la localización de ^{111}In -ch806 fue alta incluso en pacientes con baja expresión de 806 evaluada por inmunohistoquímica de muestras tumorales almacenadas (Figura 96). La captación de ^{111}In -ch806 en glioma fue particularmente impresionante (Figura 97), y comparable con cualquier dato publicado sobre anticuerpos que reconocen un tumor cerebral después de infusión sistémica o incluso infusión locorregional. Estos datos apoyan la selectividad única de ch806 a EGFR expresado por una amplia gama de tumores, y confirma la falta de captación por tejido normal de este anticuerpo en humanos.

[0588] Los análisis farmacocinéticos mostraron que ch806 tiene una semivida terminal de más de una semana, y sin dependencia de la dosis de la depuración sérica de ^{111}In -ch806. También se observaron relaciones lineales para AUC, C_{max} y C_{min}, con niveles de dosis superiores a 10 mg/m^2 logrando concentraciones séricas mínimas superiores a 1 ug/ml . Los valores de V₁, Cl, T_{1/2 α} y T_{1/2 β} fueron consistentes entre los niveles de dosis, y con el mantenimiento de los anticuerpos humanos IgG1 típicos (Scott et al, 2005; Steffens et al. (1997) J. Clin Oncol 15, 1529-1537; Scott et al (2001) J. Clin Oncol 19 (19), 3976-3987). La depuración de ch806 también se determinó que más lenta cuando los cálculos de ch806 por ELISA se compararon con las mediciones de ^{111}In -ch806. Aunque esta diferencia puede explicarse por el pequeño número de pacientes estudiados, puntos de tiempo de muestreo más largos para el ELISA de ch806 apoyarían este valor como más representativo de la verdadera depuración de ch806. Los valores farmacocinéticos para ch806 son comparables a otros anticuerpos quiméricos descritos hasta la fecha (Steffens et al., 1997; Scott et al, 2001), y apoya una pauta de dosificación semanal de ch806.

[0589] Los resultados de dosimetría cuantitativa y farmacocinéticas indican que no hay compartimento de tejido normal saturable para ch806 para los niveles de dosis evaluados en este ensayo. Es importante destacar que la falta de dependencia de la dosis en la farmacocinética y la depuración de todo el cuerpo y el órgano hígado está en marcado contraste con todos los estudios descritos de anticuerpos para wtEGFR (Baselga J. y Artega CL (2005) J.

Clin Oncol 23, 2445-2449; Divgi et al J. Natl Cancer Inst 83 (2), 97-104; Baselga J (2001) Eur J. Cancer 37 Suppl 4, S16-22; Gibson et al (2006) Clin Cancer Colorrectal 6 (1), 29-31; Rowinsky et al (2004) J. Clin Oncol 22, 3003-3015; Tan et al (2006) Clin Cancer Res 12 (21), 6517-6522) que apoyan la especificidad de tumor y la falta de unión a tejido normal de ch806 en los seres humanos. Estas observaciones proporcionan una evidencia convincente del potencial para ch806 (o formas humanizadas) para reconocer selectivamente EGFR en el tumor, evitar la toxicidad normal de otros anticuerpos de EGFR e inhibidores de quinasa (especialmente la piel) (Lacouture AE (2006), Nature Rev. Cancer 6, 803 -812; Adams G.P. y Weiner L.M. (2005) Nat. Biotechnol. 23 (9), 1147-1157) y, potencialmente, alcanzar un mayor efecto terapéutico. Además, la posibilidad de liberación de carga útil (debido a la rápida internalización de mAb 806 en las células tumorales), y el tratamiento de combinación con otros agentes biológicos, tales como anticuerpos de EGFR e inhibidores de la tirosina quinasa, donde la toxicidad se combina, probable se minimiza, están fuertemente apoyados por los datos de esta prueba. Este estudio proporciona evidencia clara de la capacidad para reconocer un epítipo en EGFR que es específico para el tumor, y el desarrollo clínico de este enfoque único para la terapia del cáncer está en curso.

15 Ejemplo 26

Comparación de secuencias

20 **[0590]** Las CDR de cadena VH y cadena VL para cada uno de mAb806, mAb175, mAb124, mAb1133 y hu806 se exponen y se comparan en este documento.

Tabla 13

<u>Comparaciones (Kabat)¹ de isotipo y secuencia CDR de anticuerpo murino</u>			
A. Cadena ligera variable			
	CDR1	CDR2	CDR3
806 (IgG2b)	HSSQDINSNIG (SEQ ID NO:18)	HGTNLDD (SEQ ID NO:19)	VQYAQFPWT (SEQ ID NO:20)
124 (IgG2a)	HSSQDINSNIG (SEQ ID NO:28)	HGTNLDD (SEQ ID NO:29)	VQY <u>G</u> QFPWT (SEQ ID NO:30)
175	HSSQDI <u>S</u> SNIG (SEQ ID NO:135)	HGTN <u>L</u> ED (SEQ ID O:136)	VQY <u>G</u> QFPWT (SEQ ID NO:137)
1133 (IgG2a)	HSSQDINSNIG (SEQ ID NO:38)	HGTNLDD (SEQ ID NO:39)	VQY <u>G</u> QFPWT (SEQ ID NO:40)
B. Cadena pesada variable			
	CDR1	CDR2	CDR3
306 (IgG2b)	SDFAWN (SEQ ID NO:15)	YISYSGNTRYNP <u>S</u> LKS (SEQ ID NO:16)	VTAGRGFPY (SEQ ID NO:17)
124 (IgG2a)	SDY <u>A</u> WN (SEQ ID NO:23)	YISY <u>S</u> ANTRYNP <u>S</u> LKS (SEQ ID NO:24)	<u>A</u> TAGRGFPY (SEQ ID NO:25)
175 (IgG2a)	SDY <u>A</u> WN (SEQ ID NO:130)	YISY <u>S</u> ANTRYNP <u>S</u> LKS (SEQ ID NO:131)	<u>A</u> TAGRGFPY (SEQ ID NO:132)
1133 (IgG2a)	SDY <u>A</u> WN (SEQ ID NO:33)	YISYSGNTRYNP <u>S</u> L <u>R</u> S (SEQ ID NO:34)	<u>A</u> TAGRGFPY (SEQ ID NO:35)
¹ diferencias con las secuencias de CDR de mAb806 están subrayadas			

25 **[0591]** Las CDR proporcionadas anteriormente para los respectivos isotipos de anticuerpos se basan en un análisis de Kabat. Como será evidente para los expertos en la técnica, las CDR pueden también definirse en base a otros análisis, por ejemplo una composición de las definiciones de Kabat y de Chothia. Por ejemplo, aplicando un análisis compuesto de Kabat y Chothia a los isotipos anteriores, las secuencias de las CDR de la cadena VL y las CDR de la cadena VH para los respectivos isotipos son como se exponen en la Tabla 14.

30 Tabla 14

<u>Comparaciones de isotipo y secuencia CDR de anticuerpo murino (composición Kabat y Chothia)¹</u>			
A. Cadena ligera variable			
	CDR1	CDR2	CDR3
806 (IgG2b)	HSSQDINSNIG (SEQ ID NO:18) ²	HGTNLDD (SEQ ID NO:139) ²	VQYAQFPWT (SEQ ID NO:20) ²
124 (IgG2a)	HSSQDINSNIG (SEQ ID NO:28)	HGTNLDD (SEQ ID NO:140)	VQY <u>G</u> QFPWT (SEQ ID NO:30)

175	HSSQDISSNIG (SEQ ID NO:135)	HGTNLED (SEQ ID NO:141)	VQYGQFPWT (SEQ ID NO:137)
1133 (IgG2a)	HSSQDINSNIG (SEQ ID NO:38)	HGTNLDD (SEQ ID NO:142)	VQYGQFPWT (SEQ ID NO:40)
B. Cadena pesada variable			
	CDR1	CDR2	CDR3
306 (IgG2b)	GYSITSDFAWN (SEQ ID NO:143) ³	GYISYSGNTRYNP ^S SLKS (SEQ ID NO:144) ³	VTAGRGFPY (SEQ ID NO:17)
124 (IgG2a)	GYSITSD ^Y AWN (SEQ ID NO:145)	GYISYSA ^N TRYNP ^S SLKS (SEQ ID NO:146)	A ^T TAGRGFPY (SEQ ID NO:25)
175 (IgG2a)	GYSITSD ^Y AWN (SEQ ID NO:147)	GYISYSA ^N TRYNP ^S SLKS (SEQ ID NO:148)	A ^T TAGRGFPY (SEQ ID NO:132)
1133 (IgG2a)	GYSITSD ^Y AWN (SEQ ID NO:149)	GYISYSGNTRYNP ^S SLRS (SEQ ID NO:150)	A ^T TAGRGFPY (SEQ ID NO:35)
¹ diferencias con las secuencias de CDR de mAb806 están subrayadas ² véase la figura 17 de la solicitud de patente de Estados Unidos no. 10/145,598 (patente de Estados Unidos 7,589,180) ³ véase la figura 16 de la solicitud de patente de Estados Unidos no. 10/145,598 (patente de Estados Unidos 7,589,180)			

Tabla 15

Comparaciones (Kabat)¹ de secuencia CDR de mAb806 y hu806			
A. Cadena ligera variable			
	CDR1	CDR2	CDR3
mAb806	HSSQDINSNIG (SEQ ID NO:18)	HGTNLDD (SEQ ID NO:19)	VQYAQFPWT (SEQ ID NO:20)
hu806	HSSQDINSNIG (SEQ ID NO:49)	HGTNLDD (SEQ ID NO:50)	VQYAQFPWT (SEQ ID NO:51)
B. Cadena pesada variable			
	CDR1	CDR2	CDR3
mAb806	SDFAWN (SEQ ID NO:15)	YISYSGNTRYNP ^S SLKS (SEQ ID NO:16)	VTAGRGFPY (SEQ ID NO:17)
hu806	SDFAWN (SEQ ID NO:44)	YISYSGNTRY ^Q P ^S SLKS (SEQ ID NO:45)	VTAGRGFPY (SEQ ID NO:46)
¹ diferencias con las secuencias de CDR de mAb806 están subrayadas			

5

[0592] Como se muestra arriba, las secuencias de CDR de los isotipos mAb806, mAb175, mAb124 y mAb1133 son idénticas excepto por los cambios de aminoácidos altamente conservadores que se esperaría que dieran lugar a un plegamiento de proteínas homólogo para el reconocimiento de epítomos. Estos datos, acumulativamente con los datos de unión y otros datos proporcionadas en los Ejemplos anteriores, muestra que estos isotipos y el hu806 son variantes de un miembro de la familia estrechamente relacionadas que muestran las mismas propiedades únicas discutidas anteriormente para mAb806 (por ejemplo, la unión a un epítopo en el EGFR que es accesible a la unión sólo en formas sobreexpresadas, mutadas o activadas de ligando del EGFR, lo que resulta en la especificidad única para el EGFR expresado en tumor, pero no wtEGFR en el tejido normal) y demuestran que los anticuerpos de secuencias de región variable distinta, particularmente de diferentes secuencias de CDR, tienen las mismas características y capacidades de unión.

10

15

Referencias

20

[0593]

- Aboud-Pirak, E., Hurwitz, E., Bellot, F., Schlessinger, J., and Sela, M. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86,3778-3781.
- Aboud-Pirak, E., Hurwitz, E., Pirak, M. E., Bellot, F., Schlessinger, J., and Sela, M. (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80, 1605-1611.
- 5 Arteaga, C. 1. and Baselga, J. (2004) *Cancer Cell.* 5, 525-531.
- Ashley, D. M., Batra, S. K., and Bigner, D. D. "Monoclonal antibodies to growth factors and growth factor receptors: their diagnostic and therapeutic potential in brain tumors." *J. Neurooncol.*, 35: 259-273,1997.
- Atlas, I., Mendelsohn, J., Baselga, J., Fair, W. R., Masui, H., and Kumar, R. "Growth regulation of human renal carcinoma cells: role of transforming growth factor α ." *Cancer Res.*, 52: 3335-3339, 1992.
- 10 Baselga J, Pfister D, Cooper MR, et al. "Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin." *J. Clin. Oncol.* 2000; 18: 904-14.
- Baselga, J. (2006) *Science.* 312, 1175-1178.
- Baselga, J. and Arteaga, C. L. (2005) *J. Clin. Oncol.* 23,2445-2459.
- Baselga, J. Clinical trials of Herceptin (R) (trastuzumab). *Eur. J. Cancer*, 37: 1824,2001.
- 15 Baselga, J., Norton, L., Albanell, J., Kim, Y. M., and Mendelsohn, J. "Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts." *Cancer Res.*, 58: 2825-2831, 1998.
- Baselga, J., Norton, L., Masui, H., Pandiella, A., Coplan, K., Miller, W. H., and Mendelsohn, J. "Antitumor effects of doxorubicin in combination with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies." *J. Natl. Cancer Inst.*
- 20 (Bethesda), 85: 1327-1333,1993.
- Baselga, J., Pfister, D., Cooper, M. R., Cohen, R., Burtness, B., Bos, M., D'Andrea, G., Seidman, A., Norton, L., Gunnnett, K., Falcey, J., Anderson, V., Waksal, H., and Mendelsohn, J. "Phase I Studies of Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Chimeric Antibody C225 Alone and in Combination With Cisplatin." *J. Clin. Oncol.* 18: 904, 2000.
- Baselga, J., Tripathy, D., Mendelsohn, J., Baughman, S., Benz, C. C, Dantis, L., Sklarin, N. T., Seidman, A. D.,
- 25 Hudis, C. A., Moore, J., Rosen, P. P., Twaddell, T., Henderson, 1. C., and Norton, L. "Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer." *J. Clin. Oncol.*, 14: 737-744,1996.
- Batra SK, Castelino-Prabhu S, Wikstrand CJ, et al. "Epidermal growth factor ligand-independent, unregulated, cell transforming potential of a naturally occurring human mutant EGFRvIII gene." *Cell Growth Differ.* 1995; 6: 1251-9.
- 30 Bernier, J. (2006) *Expert. Rev Anticancer Ther.* 6, 1539-1552.
- Bhattacharya-Chatterjee, M., S. K. Chatterjee, et al. (2001). "The anti-idiotypic vaccines for immunotherapy." *Curr. Opin. Mol. Ther.* 3(1): 63-9. *Biol. Cell.* 13,4029-4044.
- Bouyain, S., Longo, P. A., Li, S., Ferguson, K. M., and Leahy, D. J. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 15024-15029.
- 35 Brady, L. W., Miyamoto, C., Woo, D. V., Rackover, M., Emrich, J., Bender, H., Dadparvar, S., Steplewski, Z., Koprowski, H., Black, P., et al. "Malignant astrocytomas treated with iodine-125 labeled monoclonal antibody 425 against epidermal growth factor receptor: a Phase I trial." *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 22: 225-230, 1992.
- Brown, G. and N. Ling (1988). *Murine Monoclonal Antibodies. Antibodies, Volume 1. A Practical Approach.* D. Catty. Oxford, England, IRL Press: 81-104.
- 40 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.
- Chao, G., Cochran, 1. R, and Wittrup, K. D. (2004) *J. Mol. Biol.* 342,539-550.
- Cho, H. S. and Leahy, D. J. (2002) *Science* 297, 1330-1333.
- Cho, H. S., Mason, K., Ramyar, K. x., Stanley, A. M., Gabelli, S. B., DeUley, D. W., Jr., and Leahy, D. J. (2003)
- 45 *Nature* 421, 756-760.
- Clarke, K., et al., "In vivo biodistribution of a humanized anti-Lewis Y monoclonal antibody (hu3S193) in MCF-7 xenografted BALB/c nude mice." *Cancer Res*, 2000. 60(17): p. 4804-11. Clarke, K., Lee, F. T., Brechbiel, M. W., Smyth, F. E., Old, L. J., and Scott, A. M. "Therapeutic efficacy of anti-Lewis (y) humanized 3S 193 radioimmunotherapy in a breast cancer model: enhanced activity when combined with Taxol chemotherapy." *Clin. Cancer Res.*, 6: 3621-3628, 2000.
- 50 Clayton, A. H., Walker, F., Orchard, S. G., Henderson, C., Fuchs, D., Rothacker, J., Nice, E. C., and Burgess, A. W. (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 30392-30399.
- Daugherty BL, DeMartino JA, Law MF, Kawka DW, Singer II, Mark GE. "Polymerase chain reaction facilitates the cloning, CDR-grafting, and rapid expression of a murine monoclonal antibody directed against the CD18 component of leukocyte integrins." *Nucleic Acids Res.* 1991 19(9):2471-6.
- 55 de Larco, J. E. and Todaro, G. J. (1978) *J. Cell. Physiol.* 94, 335-342.
- de Larco, J. E., Reynolds, R., Carlberg, K., Engle, C., and Todaro, G. J. (1980) *J. Biol. Chem.* 255,3685-3690.
- den Eynde, B. and Scott, A. M. *Tumor Antigens.* en: P. J. Delves and I. M. Roitt (eds.), *Encyclopedia of Immunology*, Segunda edición, pp. 2424 31. London: Academic Press, 1998.
- 60 DeNardo SJ, Kroger LA, DeNardo GL. "A new era for radiolabeled antibodies in cancer?" *Curr. Opin. Immunol.* 1999; 11: 563-9.
- Divgi, C. R., Welt, S., Kris, M., Real, F. X., Yeh, S. D., Gralla, R., Merchant, B., Schweighart, S., Unger, M., Larson, S. M., et al. "Phase I and imaging trial of indium 11-labeled anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 in patients with squamous cell lung carcinoma." *J. Natl. Cancer Inst.*, 83: 97-104,1991.
- 65 Domagala, T., Konstantopoulos, N., Smyth, F., Jorissen, R. N., Fabri, L., Geleick, D., Lax, I., Schlessinger, J., Sawyer, W., Howlett, G. J., Burgess, A. W., and Nice, E. C. "Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the

- interaction between Epidermal Growth Factor (EGF) and the Extracellular Domain of the EGF receptor." *Growth Factors*. 18: 11-29, 2000.
- Domagala, T., N. Konstantopoulos, et al. (2000)."Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between epidermal growth factor (EGF) and the extracellular domain of the EGF receptor." *Growth Factors* 18 (1):11-29.
- 5 Safa, M. M. and K. A. Foon (2001). "Adjuvant immunotherapy for melanoma and colorectal cancers." *Semin. Oncol.* 28 (1): 68-92.
- Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, et al. "Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N or C-terminal tails." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 4309-13.
- 10 Ekstrand, A. J., James, C. D., Cavenee, W. K., Seliger, B., Pettersson, R. F., and Collins, V. P. (1991) *Cancer Res.* 51,2164-2172.
- Emsley, P. and Cowtan, K. (2004) *Acta crystallographica* 60, 2126-2132.
- Faillot, T., Magdelenat, H., Mady, E., Stasiecki, P., Fohanno, D., Gropp, P., Poisson, M., and Delattre, J. Y. "A Phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas." *Neurosurgery (Baltimore)*, 39: 478-483, 1996.
- 15 Fairlie, W. D., Uboldi, A. D., De Souza, D. P., Hemmings, G. 1, Nicola, N. A., and Baca, M. (2002) *Protein expression and purification* 26, 171-178.
- Fan, Z., and Mendelsohn, J. "Therapeutic application of anti-growth factor receptor antibodies." *Curr. Opin. Oncol.* 10: 67-73, 1998.
- Fan, Z., Baselga, J., Masui, H., and Mendelsohn, J. "Antitumor effect of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies plus cis-diamminedichloroplatinum on well established A431 cell xenografts." *Cancer Res.*, 53: 4637-4642, 1993.
- Fan, Z., Masui, H., Altas, I., and Mendelsohn, J. "Blockade of epidermal growth factor receptor function by bivalent and monovalent fragments of 225 anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies." *Cancer Res.*, 53: 4322-4328, 1993.
- 25 Feldkamp, M. M., Lala, P., Lau, N., Roncari, L., and Guha, A. "Expression of activated-epidermal growth factor receptors, Ras-guanosine triphosphate, and mitogenactivated protein kinase in human glioblastoma multiforme specimens." *Neurosurgery (Baltimore)*, 45: 1442-1453, 1999.
- 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.
- Fernandes H, Cohen S, Bishayee S. "Glycosylation-induced conformational modification positively regulates receptor- receptor association: a study with an aberrant epidermal growth factor receptor (EGFRVIII/deEGFR) expressed in cancer cells." *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 5375-83.
- 35 Filmus J, Pollak MN, Cailleau R, et al. "MDA-468, a human breast cancer cell line with a high number of epidermal growth factor (EGF) receptors, has an amplified EGF receptor gene and is growth inhibited by EGF." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985; 128: 898-905.
- Filmus, J., Trent, J. M., Pollak, M. N., and Buick, R. N. "Epidermal growth factor receptor gene-amplified MDA-468 breast cancer cell line and its nonamplified variants." *Mol. Cell. Biol.*, 7: 251-257, 1987.
- 40 Gadella, T. W. J. and Jovin, T. M. (1995) *Journal of Cell Biology* 129,1543-1558.
- Gan H.K., Walker F., Burgess A.W., Rigopoulos A., Scott A.M. and Johns T.G. "The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Tyrosine Kinase Inhibitor AG1478 Increases the Formation of Inactive Untethered EGFR Dimers: Implications For Combination Therapy With Monoclonal Antibody 806." *J. Biol. Chem.* (2007);282 (5):2840-50.
- Garcia de Palazzo, I.E., Adams, G. P., Sundareshan, P., Wong, A. J., Testa, J. R., Bigner, D. D., and Weiner, L. M. "Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell along carcinomas." *Cancer Res.*, 53: 3217-3220, 1993.
- 45 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.
- 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.
- 50 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.
- Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, et al. "Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model." *Clin. Cancer Res.* 1995; 1: 1311-8.
- 55 Grandis, J. R., Melhem, M. F., Gooding, W. E., Day, R., Holst, V. A., Wagener, M. M., Drenning, S. D., and Tweardy, D. J. "Levels of TGP-a and BOFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival." *J. Natl. Cancer Inst.*, 90: 32CE, 1998.
- Green, M. C., Murray, J. L., and Hortobagyi, G. N. "Monoclonal antibody therapy for solid tumors." *Cancer Treat. Rev.*, 26: 269-286, 2000.
- 60 Gunther, N., Betzel, C., and Weber, W. "The secreted form of the epidermal growth factor receptor. Characterization and crystallization of the receptor ligand complex." *J. Biol. Chem.* 265:22082-5, 1990.
- Halaisch, M. E., Schmidt, U., Botefur, I. C., Holland, J. P., and Ohnuma, T. "Marked inhibition of glioblastoma target cell tumorigenicity in vitro by retrovirus-mediated transfer of a hairpin ribozyme against deletion-mutant epidermal growth factor receptor messenger RNA." *J. Neurosurg.*, 92: 297-305, 2000.

- Han, Y., Caday, C. G., Nanda, A., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. "Tyrphostin AG1478 preferentially inhibits human glioma cells expressing truncated rather than wild-type epidermal growth factor receptors. *Cancer Res.* 56:3859-3861, 1996.
- 5 Harari, D., and Yarden, Y. "Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer." *Oncogene*, 19: 6102-6114, 2000.
- Hills D, Rowlinson-Busza G, Gullick WJ. "Specific targeting of a mutant, activated EGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody." *Int. J. Cancer* 1995; 63: 537-43.
- Hogg, P. J. (2003) *Trends in biochemical sciences* 28, 210-214.
- 10 Holbro, T. and Hynes, N. E. (2004) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44:195-217., 195-217.
- Hoof, R. W., Vriend, G., Sander, C., and Abola, E. E. (1996) *Nature* 381,272.
- Huang HS, Nagane M, Klingbeil CK, et al. "The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling." *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 2927-35.
- 15 Humphrey, P. A., Wong, A. I., Vogelstein, B., Zalutsky, M. R., Fuller, G. N., Archer, G. E., Friedman, H. S., Kwatra, M. M., Bigner, S. H., and Bigner, D. D. "Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma" (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4207-4211.
- Johns TG, Perera RM, Vernes SC, Vitali AA, Cao DX, Cavenee WK, Scott AM and Furnari FB. "The efficacy of EGFR-specific antibodies against glioma xenografts is influenced by receptor levels, activation status and heterodimerization." *Clin. Cancer Res.* (2007);13(6): 1911-1925.
- 20 Johns TG, Stockert E, Ritter G, Jungbluth AA, H-J. Su Huang, Cavenee WK, Smyth FE, Hall CM, Watson N, Nice EC, Gullick WJ, Old LJ, Burgess AW, Scott AM. "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* (2002) 98: 398-408
- 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., Ritter, G., Jungbluth, A.A., Old, L.J., Ward, C.W., Burgess, A.W., Wittrup, K.D., and Scott, A.M. "Identification
- 25 of the Epitope for the EGFR-Specific Monoclonal Antibody 806 Reveals that it Preferentially Recognizes an Untethered Form of the Receptor." *J. Biol. Chem.* (2004) 279: 30375-30384
- Johns, T.G., et al., "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*, 2002. 98(3): p. 398-408.
- 30 Johns, T.G., Luwor, R.B., Murone, C., Walker, F., Weinstock, J., Vitali, A.A., Perera, R.M., Old, L.J., Nice, E.C., Burgess, A.W. and Scott, A.M. "Anti-tumor efficacy of cytotoxic drugs and the monoclonal antibody 806 is enhanced by the epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor AG1478." *PNAS*(2003) 100: 15871-15876
- 35 Johns, T.G., Mellman I., Cartwright G.A., Ritter G., Old L.J., Burgess A. W. and Scott A.M. "The anti-tumor monoclonal antibody 806 recognizes a high-mannose form of the EGF receptor that reaches the cell surface when cells overexpress the receptor." *FASEB J.* (2005) 19(7):780-2.
- Jorissen, R. N., Walker, F. W., Pouliot, N., Garrett, T. P. J., Ward, C. W., and Burgess, A. W. "Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signaling." *Exp. Cell Res.* 284, 31-53.2003.
- 40 Jungbluth, A.A., Stockert, E., Huang, H-J.S., Collins, VP, Coplan, K., Iversen, K., Kolb, D., Johns T.G., Scott A. M., Gullick W.J., Ritter, G., Cohen L., Cavenee W.K., Old, L.J. A "Monoclonal Antibody Recognizing Human Cancers with Amplification/Over- Expression of the Human Epidermal Growth Factor Receptor." *PNAS* (2003) 100: 639- 644.
- Korshunov, A., Golanov, A., Sycheva, R., and Pronin, I. "Prognostic value of tumor associated antigen immunoreactivity and apoptosis in cerebral glioblastomas: an analysis of 163 cases." *J. Clin. Pathol.*, 52,-574-580, 1999.
- 45 Kwok TT, Sutherland RM. "Differences in EGF related radiosensitisation of human squamous carcinoma cells with high and low numbers of EGF receptors." *Br. J. Cancer* 1991; 64: 251-4. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993) *J. Appl. Cryst.* 26, 283-291.
- Lee F.T., Mountain A.J., O'Keefe G.J., Sagona J., Rigopoulos A., Smyth F.E., Govindan S.V., Goldenberg D.M., Old L.J. and Scott A.M. "ImmunoPET detection of xenografts expressing de2-7 EGFR using Iodine-124 labelled ch806 via residualising ligand IMPR4." *J. Nucl. Med.* (2006) 47 (5) suppl 1: 429P.
- 50 Li D., Ji H., Zaghul S., McNamara K., Liang M.C., Shimamura T., Kubo S., Takahashi M., Chirieac L.R., Padera R.F., Scott A.M., Jungbluth, A.A., Cavenee W.K., Old L.J., Demetri G.D., Wong KK. "Therapeutic anti-EGFR antibody 806 generates responses in murine de novo EGFR mutant-dependent lung carcinomas." *J. Clin. Invest.* (2007); 117(2): 346-352.
- Lindmo, T., et al., "Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess." *J. Immunol. Methods*, 1984. 72(1): p. 77-89.
- 60 Liu, Z., Panousis, C., Smyth, F.E., Murphy, R., Wirth, V., Cartwright, G., Johns, T.G., and Scott, A.M. "Generation of Anti-Idiotypic Antibodies for Application in Clinical Immunotherapy Laboratory Analyses." *Hybridoma and Hybridomics*, (2003) 22 (4): 219- 228.
- Luwor RB, Johns TG, Murone C, H-J. Su Huang, Cavenee WK, Ritter G, Old LJ, Burgess AW, Scott AM. "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 Research* (2001) 61: 5355-5361.
- 65 Luwor, R.B., Zhu, H-J., Walker, F., Vitali A.A., Perera, R.M., Burgess, A.W., Scott, A.M. and Johns, T.G. "The Tumor Specific de2-7 Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) confers Increased survival in BaF/3 Cells Via a PI-3 Kinase Dependent Mechanism." *Oncogene* (2004) 23: 6095-6104

- MacDonald, A., Chisholm, G. D., and Habib, F. K. (1990) *Br. J. Cancer*. 62,579-584.
- Masui, H., Kawamoto, T., Sato, J. D., Wolf, B., Sato, G., and Mendelsohn, J. "Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies." *Cancer Res.*, 44: 1002-1007, 1984.
- Mellinghoff, I. K., Cloughesy, T. F., and Mischel, P. S. (2007) *Clin. Cancer Res.* 13,378-381.
- 5 Mendelsohn, J. "Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as anticancer therapy. *Clin. Cancer Res.*" 3:2703-2707, 1997.
- Mickey, D. D., Stone, K. R., Wunderli, H., Mickey, G. H., Vollmer, R. T., and Paulson, D. F. (1977) *Cancer Res.* 37,4049-4058.
- Mineo C, Gill GN, Anderson RG. "Regulated migration of epidermal growth factor receptor from caveolae." *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 30636-43.
- 10 Mishima K, Johns TG, Luwor RB, Scott AM, Stockert E, Jungbluth AA, Ji X, Suvarna P, Volland JR, Old LJ, H-J. Su Huang, Cavenee WK. "Growth Suppression of Intracranial Xenografted Glioblastomas Overexpressing Mutant Epidermal Growth Factor Receptors by Systemic Administration of Monoclonal Antibody (mAb) 806, a Novel Monoclonal Antibody Directed to the Receptor." *Cancer Research* (2001) 61: 5349-5354.
- 15 Mishima, K. Nagane, M., Lin, H., Cavenee, W. K., and Huang, H-J. S. "Expression of a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor mediates glioma cell invasion in vivo." *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 40: 519,1999.
- Mishima, K., Mazar, A. P., Gown, A., Skelly, M., Ji, X. D., Wang, X. D., Jones, T. R., Cavenee, W. K., and Huang, H-J. S. "A peptide derived from the non-receptor-binding region of urokinase plasminogen activator inhibits glioblastoma growth and angiogenesis in vivo in combination with cisplatin." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 8484-8489,
- 20 2000. Moscatello, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P. W., Biegel, J. A., Hayes R. L., and Wong, A. J. "Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors." *Cancer Res.*, 55: 5536-5539,1995.
- 25 Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) *Acta crystallographica* 53, 240-255.
- Nagane, M., Coufal, F., Lin, H., Bogler, O., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. "A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis." *Cancer Res.* 56: 5079-86,1996.
- 30 Nagane, M., Levitzki, A., Gazit, A., Cavenee, W. K., and Huang, H-J. S. "Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-XL and caspase-3-like proteases." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 5724-5729, 1998.
- Nagane, M., Lin, H., Cavenee, W. K., and Huang, H-J. S. "Aberrant receptor signaling in human malignant gliomas: mechanisms and therapeutic implications." *Cancer Lett.*, 162 (Suppl. 1):S17-S21, 2001.
- 35 Neidhardt, F. C., Bloch, P. L., and Smith, D. F. (1974) *Journal of bacteriology* 119, 736-747.
- Nishikawa, R., Ji, X. D., Harmon, R. C., Lazar, C. S., Gill, G. N., Cavenee, W. K., and Huang, H. J. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:7727-7731, 1994.
- Ogiso, H., Ishitani, R, Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, I. H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2002) *Cell* 20; 110, 775-787.
- 40 Okamoto S, Yoshikawa K, Obata Y, et al. "Monoclonal antibody against the fusion junction of a deletion-mutant epidermal growth factor receptor." *Br. J. Cancer* 1996; 73: 1366-72.
- Olapade-Olaopa, E. O., Moscatello, D. K., MacKay, E. H., Horsburgh, T., Sandhu, D. P., Terry, T. R., Wong, A. J., and Habib, F. K. "Evidence for the differential expression of a variant EGF receptor protein in human prostate cancer." *Br. J. Cancer.* 82: 186-94, 2000.
- 45 Old, L. J. "Immunotherapy for cancer." *Sci. Am.*, 275: 102-109,1996.
- Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997) "Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode." Academic Press (New York).
- Padlan EA. "A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties." *Mol. Immunol.* 1991 28(4-5):489-98.
- 50 Padlan et al., EP 519596, Merck/NIH
- Palacios, R, Henson, G., Steinmetz, M., and McKeam, J. P. (1984) *Nature*. 309, 126-131.
- Panousis, C., Rayzman, V.M., Johns, T.G., Renner C., Liu Z., Cartwright, G., Lee F-T., Wang, D., Gan, H., Cao, D., Kypridis, A., Smyth, F.E., Brechbiel, M.W., Burgess, A.W., Old, L.J. and Scott, A.M. "Engineering and characterization of chimeric monoclonal antibody 806 (ch806) for targeted immunotherapy of tumours expressing de2-7 EGFR or amplified EGFR." *Br. J. Cancer* (2005) 92:1069-1077.
- 55 PCT Patent WO02092771, 2002.
- Perera R.M., Nariita Y., Furnari, F.B., Luwor, R.B., Burgess, A.W., Old, L.J., Cavenee, W.K., Scott, A.M. and Johns, T.G. "A novel EGFR antibody that displays synergistic anti-tumor activity when combined with conventional EGFR therapeutics." *Clinical Cancer Research* (2005) 11: 6390-6399.
- 60 Perera R.M., Zoncu R., Johns T.G., Pypaert M., Lee F.T., Mellman 1., Old L.J., Toomre D.K., and Scott A.M. "Internalization, intracellular trafficking, and biodistribution of monoclonal antibody 806: a novel anti-epidermal growth factor receptor antibody." *Neoplasia.* (2007); 9(12):1099-110
- Perez-Soler, R., Donato, N. J., Shin, D. M., Rosenblum, M. G., Zhang, H. Z., Tornos, C., Brewer, H., Chan, J. C., Lee, J. S., Hong, W. K., et al. "Tumor epidermal growth factor receptor studies in patients with non-small-cell lung cancer or head and neck cancer treated with monoclonal antibody RG 83852." *J. Clin. Oncol.*, 12: 730-739, 1994.
- 65

- Pietras, R. J., Pegam, M. D., Finn, R-S., Maneval, D. A., and Slmon, D. J. "Remission of human breast cancer xenografts on therapy with humanized monoclonal antibody to HER-2 receptor and DNA-reactive drugs." *Oncogene*, 17: 2235-2249, 1998.
- Ponten J, Macintyre EH. "Long term culture of normal and neoplastic human glia." *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 1968; 74: 465-86.
- 5 Press, O. W., DeSantes, K., Anderson, S. K., and Geissler, F. "Inhibition of catabolism of radiolabeled antibodies by tumor cells using lysosomotropic amines and carboxylic ionophores." *Cancer Res.* 50: 1243-50, 1990.
- Reist CJ, Batra SK, Pegram CN, et al. "In vitro and in vivo behavior of radiolabeled chimeric anti-EGFRvIII monoclonal antibody: comparison with its murine parent." *Nucl. Med. Biol.* 1997; 24: 639-47.
- 10 Reist, C. J., Archer, G. E., Kurpad, S. N., Wikstrand, C. J., Vaidyanathan, G., Willingham, M. C., Moscatello, D. K., Wong, A. J., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. "Tumor-specific anti-epidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibodies: use of the tyramine-cellobiose radioiodination method enhances cellular retention and uptake in tumor xenografts." *Cancer Res.*, 55: 4375-4382, 1995.
- Reist, C. J., Archer, G. E., Wikstrand, C. J., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. "Improved targeting of an antiepidermal growth factor receptor variant III monoclonal antibody in tumor xenografts after labeling using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate." *Cancer Res.* 57: 1510-5, 1997.
- 15 Reist, C. J., Batra, S. K., Pegram, C. N., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. "In vitro and in vivo behavior of radiolabeled chimeric anti-EGFRvIII monoclonal antibody: comparison with its murine parent." *Nucl. Med. Biol.* 24: 63947, 1997.
- 20 Reist, C. J., Garg, P. K., Alston, K. L., Bigner, D. D., and Zalutsky, M. R. "Radioiodination of internalizing monoclonal antibodies using N-succinimidyl 5-iodo-3-pyridinecarboxylate." *Cancer Res.* 56: 4970-7, 1996.
- Rodeck, U., Herlyn, M., Herlyn, D., Molthoff, C., Atkinson, B., Varello, M., Steplewski, Z., and Koprowski, H. "Tumor growth modulation by a monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor: immunologically mediated and effector cell-independent effects." *Cancer Res.*, 47: 3692-3696, 1987.
- 25 Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F., and Normanno, N. "Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies." *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 19: 183-232, 1995.
- Sampson, J. H, Crotty, L. E., Lee, S., Archer, G. E., Ashley, D. M., Wikstrand, C. J., Hale, L. P., Small, C., Dranoff, G., Friedman, A. H., Friedman, H. S., and Bigner, D. D, "Unarmed, tumor-specific monoclonal antibody effectively treats brain tumors." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 7503-7508, 2000.
- 30 Santon, J. B., Cronin, M. T., MacLeod, C. L., Mendelsohn, J., Masui, H., and Gill, G. N. "Effects of epidermal growth factor receptor concentration on tumorigenicity of A431 cells in nude mice." *Cancer Res.* 46: 4701-5, 1986.
- Sato, J. D., Le, A. D., and Kawamoto, T. "Derivation and assay of biological effects of monoclonal antibodies to epidermal growth factor receptors." *Methods Enzymol.* 146: 63-81, 1987.
- Schlessinger, J. (2002) *Cell* 20; 110,669-672.
- 35 Scott A.M., Gill S. S., Lee F., Liu Z., Skrinos E., Murone C., Saunder T., Chappell B., Papenfuss A., Old L.J. "A Phase I single dose escalation trial of ch806 in patients with advanced tumors expressing the 806 antigen." *Journal of Clinical Oncology*, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. Vol. 24, No. 18S (June 20 Supplement), (2006): 13028.
- Scott A.M., Lee FT., Tebbutt N., Herbertson R., Gill S.S., Liu Z., Skrinos E., Murone C., Saunder T.H., Chappell B., Papenfuss A.T., Poon A.M.T., Hopkins W., Smyth F.E., MacGregor D., Cher L.M., Jungbluth A.A., Ritter, G., Brechbiel M.W., Murphy R., Burgess AW, Hoffman E.W., Johns T.J., Old L.J. "A Phase I clinical trial with monoclonal antibody ch806 targeting transitional state and mutant epidermal growth factor receptors." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (2007) 104 (10): 4071-6. Epub 2007 February 28.
- 40 Scott, A. M., and Welt, S. Antibody-based immunological therapy. *Curr. Opin. Immunol.*, 9: 717-722, 1997.
- 45 Seymour L. "Novel anti-cancer agents in development: exciting prospects and new challenges." *Cancer Treat. Rev.* 1999; 25: 301-12.
- Sizeland, A. M. and Burgess, A. W. (1991) *Mol. Cell Bio.* 11, 4005-4014.
- Sizeland, A. M. and Burgess, A. W. (1992) *Mol. Biol. Cell* 3, 1235-1243.
- 50 Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A., and Press, M. F. "Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer." *Science (Wash. DC)*. 244: 707-712,1989.
- Sliwkowski, M. X., Lofgren, J. A., Lewis, G. D., Hotaling, T. E., Fendly, B. M., and Fox, J. A. "Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin)." *Semin. Oncol.*, 26 (Suppl. 12): 60-70,1999.
- 55 Sok, J. c., Coppelli, F. M., Thomas, S. M., Lango, M. N., Xi, S., Hunt, J. 1., Freilino, M. 1., Graner, M. W., Wikstrand, C. J., Bigner, D. D., Gooding, W. E., Furnari, F. B., and Grandis, J. R. (2006) *Clin. Cancer Res.* 12,5064-5073.
- Stamos, J., Sliwkowski, M. X., and Eigenbrot, C. (2002) *J. Biol. Chem.* 277,46265-46272.
- Sturgis, E. M., Sacks, P. G., Masui, H., Mendelsohn, J., and Schantz, S. P. "Effects of antiepidermal growth factor receptor antibody 528 on the proliferation and differentiation of head and neck cancer." *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 111: 633-43,1994.
- 60 Sugawa, N., Ekstrand, A. J., James, C. D., and Collins, V. P. "Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 8602-8606, 1990.
- Tang, C. K., Gong, X. Q., Moscatello, D. K., Wong, A. J., and Lippman, M. E. "Epidermal growth factor receptor in enhances tumorigenicity in human breast cancer." *Cancer Res.*, 60: 3081-3087, 2000.
- 65 Teramoto, T., Onda, M., Tokunaga, A., and Asano, G. "Inhibitory effect of antiepidermal growth factor receptor antibody on a human gastric cancer." *Cancer (Phila.)*, 77: 1639-1645, 1996.

- Todaro, G. J., Delarco, J. E., and Cohen, S. (1976) *Nature* 264, 26-31.
- Trail, P. A., and Bianchi, A. B. "Monoclonal antibody drug conjugates in the treatment of cancer." *Curr. Opin. Immunol.* 11: 584-588, 1999.
- Uemura, H., E. Okajima, et al. (1994). "Internal image anti-idiotype antibodies related to renal-cell carcinoma-associated antigen G250." *Int. J. Cancer* 56 (4): 609-14.
- 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.
- Vagin, A. and Teplyakov, A. (1997) *J. Appl. Cryst.* 30, 1022-1025.
- van de Loosdrecht, A. A., Beelen, R. H., Ossenkoppele, G. J., Broekhoven, M. G., and Langenhuijsen, M. M. (1994) *J. Immunol. Methods.* 174,311-320.
- Voldborg, B. R., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M., and Poulsen, H. S. "Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials." *Ann. Oncol.*, 8: 1197-1206, 1997.
- Wade, J. D., Hojo, K., Kawasaki, K., Johns, T. G., Catimel, B., Rothacker, J., and Nice, E. C. (2006) *Anal. Biochem.* 348, 315-317.
- Waksal, H. W. "Role of an anti-epidermal growth factor receptor in treating cancer." *Cancer Metastasis Rev.*, 18: 427-436, 1999.
- Walker, F., Orchard, S. G., Jorissen, R N., Hall, N. E., Zhang, H. H., Hoyne, P. A., Adams, T. E., Johns, T. G., Ward, C., Garrett, T. P., Zhu, H. 1., Nerrie, M., Scott, A. M., Nice, E. C., and Burgess, A. W. (2004) *J. Biol. Chem.* 79, 22387-22398.
- Weiner, L. M. "An overview of monoclonal antibody therapy of cancer." *Semin. Oncol.*, 26 (Suppl. 12): 41-50, 1999.
- Wersall, P., Ohlsson, I., Biberfeld, P., Collins, V. P., von Krusenstjerna, S., Larsson, S., Mellstedt, H., and Boethius, J. "Intratumoral infusion of the monoclonal antibody, mAb 425, against the epidermal-growth-factor receptor in patients with advanced malignant glioma." *Cancer Immunol. Immunother.*, 44: 157-164, 1997.
- Whitson K.B., Red M.L., Whitson S.R., McCoy A., Vitali A.A., Walker F., Johns T.G., Beth A.H. and Staros J.A. "Functional Effects of Selective Glycosylation at Asn-579 of the Epidermal Growth Factor Receptor." *Biochemistry* (2005) 44: 14920-14931
- Wikstrand, C. J., Cokgor, I., Sampson, J. H., and Bigner, D. D. "Monoclonal antibody therapy of human gliomas: current status and future approaches." *Cancer Metastasis Rev.*, 18: 451-464, 1999.
- 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., et al. "Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant gliomas." *Cancer Res.* 55: 3140-3148, 1995.
- Wikstrand, C. J., McLendon, R. E., Friedman, A. H., and Bigner, D. D. "Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII." *Cancer Res.* 57: 4130-40, 1997.
- Wikstrand, C. J., Reist, C. J., Archer, G. E., Zalutsky, M. R., and Bier, D. D. "The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target." *J. Neurovirol.*, 4: 148-158, 1998.
- Wong, A. J., Ruppert, J. M., Bigner, S. H., Grzeschik, C. H., Humphrey, P. A., Bigner, D. S., and Vogelstein, B. "Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 2965-2969, 1992.
- Yamazaki H, Fukui Y, Ueyama Y, et al. "Amplification of the structurally and functionally altered epidermal growth factor receptor gene (c-erbB) in human brain tumors." *Mol. Cell Biol.* 1988; 8:1816-20.
- Yamazaki H, Ohba Y, Tamaoki N, et al. "A deletion mutation within the ligand binding domain is responsible for activation of epidermal growth factor receptor gene in human brain tumors." *Jpn. J. Cancer Res.* 1990; 81: 773-9.
- Yarden, Y. and Schlessinger, J. (1987) *Biochemistry.* 26, 1443-1451.
- Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 127-137.
- Yen, L., Benlimame, N., Nie, Z. R., Xiao, D., Wang, T., Al Moustafa, A. E., Esumi, H., Milanini, J., Hynes, N. E., Pages, G., and Alaoui-Jamali, M. A. (2002) *Mol. Biol. Cell.* 13(11):4029-44.
- Ymer, S., Tucker, W. Q., Sanderson, C. 1., Hapel, A. J., Campbell, H. D., and Young, 1. G. (1985) *Nature.* 19-25;317,255-258.
- Zhang, x., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P. A., and Kuriyan, J. (2006) *Cell.* 125, 1137-1149.
- Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW, & Yokoyama S (2003) *Mol. Cell.* 12:541-552.
- Ferguson KM (2008) *Annu. Rev. Biophys.* 37, 353-373.
- Mendelsohn J & Baselga J (2006) *Semin. Oncol.* 33, 369-385.
- Herbst RS, Kim ES, & Harari PM (2001) *Expert Opin. Biol. Ther.* 1, 719-732.
- Lynch DH & Yang XD (2002) *Semin. Oncol.* 29,47-50.
- Baselga J & Arteaga CL (2005) *J. Clin. Oncol.* 23, 2445-2459.
- Burgess AW (2008) *Growth Factors* 26, 263-274.
- Milano G, Spano JP, & Leyland-Jones B (2008) *Br. J. Cancer* 99, 1-5.
- Solomon BM & Jatoti A (2008) *Curr. Oncol. Rep.* 10, 304-308.
- Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavenee WK, & Huang HJ (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 7727-7731.
- Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Zalutsky MR, Fuller GN, Archer GE, Friedman HS, Kwatra MM, Bigner SH, & Bigner DD (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4207-4211.
- Johns TG, Stockert E, Ritter G, Jungbluth AA, Huang HJ, Cavenee WK, Smyth FE, Hall CM, Watson N, Nice EC, et al. (2002) *Int. J. Cancer.* 98, 398-408.

- Jungbluth AA, Stockert E, Huang HJ, Collins VP, Coplan K, Iversen K, Kolb D, Johns TJ, Scott AM, Gullick WJ, et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 639-644.
- Scott AM, Lee FT, Tebbutt N, Herbertson R, Gill SS, Liu Z, Skrinos E, Murone C, Saunderson TH, Chappell B, et al. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 4071-4076.
- 5 Johns TG, Luwor RB, Murone C, Walker F, Weinstock J, Vitali AA, Perera RM, Jungbluth AA, Stockert E, Old L.J., et al. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 15871-15876.
- Perera RM, Narita Y, Furnari FB, Gan HK, Murone C, Ahlkvist M, Luwor RB, Burgess AW, Stockert E, Jungbluth A.A., et al. (2005) *Clin. Cancer Res.* 11, 6390-6399.
- Johns TG, Adams TE, Cochran JR, Hall NE, Hoyne PA, Olsen MJ, Kim YS, Rothacker J, Nice EC, Walker F, et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 30375-30384.
- 10 Walker F, Orchard SG, Jorissen RN, Hall NE, Zhang HH, Hoyne PA, Adams TE, Johns TG, Ward C, Garrett TP, et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 22387-22398.
- Sivasubramanian A, Chao G, Pressler HM, Wittrup KD, & Gray JJ (2006) *Structure* 14, 401-414.
- Luwor RB, Johns TG, Murone C, Huang HJ, Cavenee WK, Ritter G, Old LJ, Burgess AW, & Scott AM (2001) *Cancer Res.* 61, 5355-5361.
- 15 Ching KZ, Ramsey E, Pettigrew N, D'Cunha R, Jason M, & Dodd JG (1993) *Mol. Cell Biochem.* 126, 151-158.
- Sizeland AM & Burgess AW (1991) *Mol. Cell Biol.* 11, 4005-4014.
- Chao G, Cochran JR, & Wittrup KD (2004) *J. Mol. Biol.* 342, 539-550.
- Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Zhu HJ, Walker F, Frenkel MJ, Hoyne PA, et al. (2002) *Cell* 110, 763-773.
- 20 Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJ, Kussie P, & Ferguson KM (2005) *Cancer Cell.* 7, 301-311.
- Hogg PJ (2003) *Trends Biochem. Sci.* 28, 210-214.
- Li S, Kussie P, & Ferguson KM (2008) *Structure* 16, 216-227.
- Schmiedel J, Blaukat A, Li S, Knochel T, & Ferguson KM (2008) *Cancer Cell* 13, 365-373.
- 25 Sandler AB (2006) *Oncology (Williston Park)* 20, 35-40.
- Sampson JH, Crotty LE, Lee S, Archer GE, Ashley DM, Wikstrand CJ, Hale LP, Small C, Dranoff G, Friedman AH, et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 7503-7508.
- Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, & Schlessinger J. (1984) *Nature.* 309,418-425.
- 30 Walker F, Hibbs ML, Zhang HH, Gonez LJ, & Burgess AW (1998) *Growth Factors* 16, 53-67.
- Wade JD, Hojo K, Kawasaki K, Johns TG, Catimel B, Rothacker J, & Nice EC (2006) *Anal. Biochem.* 348, 315-317.
- Vagin AA & Isupov MN (2001) *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 57, 1451-1456.
- Murshudov GN, Vagin AA, & Dodson EJ (1997) *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 53, 240-255.
- Ferguson KM, Berger MB, Mendrola JM, Cho HS, Leahy DJ, & Lemmon MA (2003) *Mol. Cell* 11,507-517.
- 35 Rettig WJ, Old LJ (1989) *Annu. Rev. Immunol.* 7:481-511.
- Van den Eynde BJ, Scott AM (1998) in *Encyclopedia of Immunology*, eds Roitt DPJ, Roitt IM (Academic Press: London), pp 2424-2431.
- Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA, Bodkin D, Schilder RJ, Neidhart JA, Janakiraman N, Foon KA, Liles TM, Dallaire BK, et al. (1997) *Blood* 90(6):2188-2195.
- 40 Baselga J, Arteaga CL (2005) *J. Clin. Oncol.* 23:2445-2449.
- Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, Poulsen HS (1997) *Ann. Oncol.* 8(12): 1197-206.
- Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, Sklarin NT, Seidman AD, Hudis CA, Moore J, et al. (1996) *J. Clin. Oncol.* 14:737-744.
- Welt S, Divgi CR, Real FX, Yeh SD, Garin-Chesa P, Finstad CL, Sakamoto J, Cohen A, Sigurdson ER, Kemeny N, et al. (1990) *J. Clin. Oncol.* 8(11):1894-906.
- 45 Scott AM, Lee FT, Jones R, Hopkins W, MacGregor D, Cebon J, Hannah A, U P, Rigopolous A, Sturrock S, et al. (2005) *Clin. Cancer Res.* 11(13):4810-4817.
- Steffens MG, Boerman OC, Oosterwijk-Wakka JC, Oosterhof GO, Witjes JA, Koenders EB, Oyen WJ, Buijs WC, Debruyne FM, Corstens FH, et al. (1997) *J. Clin. Oncol.* 15:1529-1537.
- 50 Scott AM, Geleick D, Rubira M, Clarke K, Nice EC, Smyth FE, Stockert E, Richards EC, Carr FJ, Harris WJ, et al. (2000) *Cancer Res* 60:3254-3261.
- Scott AM, Lee F-T, Hopkins W, Cebon JS, Wheatley JM, Liu Z, Smyth FE, Murone C, Sturrock S, MacGregor D, et al. (2001) *J. Clin. Oncol.* 19(19):3976-3987.
- Welt S, Divgi CR, Scott AM, Garin-Chesa P, Finn RD, Graham M, Carswell EA, Cohen A, Larson SM, Old LJ (1994) *J. Clin. Oncol.* 12:1193-1203.
- 55 Scott AM, Wiseman G, Welt S, Adjei A, Lee FT, Hopkins W, Divgi CR, Hanson LH, Mitchell P, Gansen DN, et al. (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1639-47.
- Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, Collins VP (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87(21):8602-8606.
- Wong AJ, Bigner SH, Bigner DD, Kinzler KW, Hamilton SR, Vogelstein B (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(19):6899-6903.
- 60 Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavenee WK, Huang HJ (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(16):7727-7731.
- Hills D, Rowlinson-Busza D, Gullick WJ (1995) *Int. J. Cancer* 63(4):537-543.
- Sridhar SS, Seymour L, Shepherd FA (2003) *Lancet Oncol.* 4(7):397-406.
- 65 Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, Rockwell P, Mendelsohn J (1995) *Clin. Cancer Res.* 1(11):1311-1318.

Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Zalutsky MR, Fuller GN, Archer GE, Friedman HS, Kwatra MM, Bigner SH, Bigner DD (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(11):4207-4211.

Baselga J, Pfister D, Cooper MR, Cohen R, Burtness B, Bos M, D'Andrea G, Seidman A, Norton L, Gunnett K, et al. (2000) J. Clin. Oncol. 18(4):904-914.

5 Graeven U, Kremer B, Sudhoff T, Kiling B, Rojo F, Weber D, Tillner J, Unal C, Schmiegel W (2006) Br. J. Cancer 94(9):1293-1299.

Ramos TC, Figueredo J, Catala M, Gonzales S, Selva JC, Cruz TM, Toldeo C, Silva S, Pestano Y, Ramos M, et al. (2006) Cancer Biol. Ther. 5(4):375-379.

10 Johns TG, Stockert E, Ritter G, Jungbluth AA, Huang HJ, Cavenee WK, Smyth FE, Hall CM, Watson N, Nice EC, et al. (2002) Int. J. Cancer 98(3):398-408.

Jungbluth AA, Stockert E, Huang HJ, Collins VP, Coplan K, Iversen K, Kolb D, Johns TG, Scott AM, Gullick WJ, et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100(2): 639-644.

Johns TG, Adams TE, Wittrup KD, Hall NE, Hoyne PA, Cochrane JR, Olsen MJ, Kim YS, Rothacker J, Nice EC, et al. (2004) J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384.

15 Johns TG, Mellman I, Cartwright GA, Ritter G, Old LJ, Burgess AW, Scott AM (2005) FASEB J. 19(7):780-782.

Luwor RB, Johns TG, Murone C, Huang HJ, Cavenee WK, Ritter G, Old LJ, Burgess AW, Scott AM (2001) Cancer Res. 61(14): p. 5355-5361.

Johns TG, Luwor RB, Murone C, Walker F, Weinstock J, Vitali AA, Perera RM, Jungbluth AA, Stockert E, Old LJ, et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(26):15871-15876.

20 Mishima K, Johns TG, Luwor RB, Scott AM, Stockert E, Jungbluth AA, Ji XD, Suvarna P, Volland JR, Old LJ, et al. (2001) Cancer Res. 61(14):5349-5354.

Perera RM, Narita Y, Furnari FB, Tavernasi ML, Luwor RB, Burgess AW, Stockert E, Jungbluth AA, Old LJ, Cavenee WK, et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11(17):6390-6399.

25 Panousis C, Rayzman VM, Johns TG, Renner C, Liu Z, Cartwright G, Lee F-T, Wang D, Kypridis A, Smyth FE, et al. (2005) Br. J. Cancer. 92(6):1069-1077.

Divgi CR, Welt S, Kris M, Real FX, Yeh SD, Gralla R, Merchant B, Schweighart S, Unger M, Larson SM, et al. (1991) J. Natl. Cancer Inst. 83(2):97-104.

Baselga J (2001) Eur. J. Cancer 37 Suppl 4:S16-22.

Gibson TB, Ranganathan A, Grothey A (2006) Clin. Colorectal Cancer 6(1):29-31.

30 Rowinsky EK, Schwartz GH, Gollob JA, Thompson JA, Vogelzang NJ, Figlin R, Bukowski R, Haas N, Lockbaum P, Li YP, et al. (2004) J. Clin. Oncol. 22:3003-3015.

Tan AR, Moore DF, Hidalgo M, Doroshow JH, Polpin EA, Goodin S, Mauro D, Rubin EH (2006) Clin. Cancer Res. 12(21): 6517-6522.

Lacouture AE (2006) Nature Rev. Cancer. 6:803-812.

35 Adams GP, Weiner LM (2005) Nat. Biotechnol. 23(9): 1147-1157.

Liu Z, Panousis C, Smyth FE, Murphy R, Wirth V, Cartwright G, Johns TG, Scott AM (2003) Hybrid Hybridomics 22(4):219-28.

Stabin MG, Sparks RB, Crowe E (2005) J. Nucl. Med. 46(6):1023-1027.

Ritter G, Cohen LS, Williams C Jr, Richards EC, Old LJ, Welt S (2001) Cancer Res. 61(18):685-6859.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0594]

- 45 <110> Ludwig Institute for Cancer Research LTD.
- <120> Proteínas de union específica y uso de las mismas
- <130> 9662W00"
- 50 <150> US 12/388,504
- <151> 2009-02-18
- <160> 195
- 55 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 402
- <212> ADN
- 60 <213> Mus musculus
- <400> 1
- atgagagtgc tgattctttt gtggctgttc acagcctttc ctggtgtcct gtctgatgtg 60
- 65 cagcttcagg agtcgggacc tagcctgggtg aaaccttctc agtctctgtc cctcacctgc 120
- actgtcactg gctactcaat caccagtgat ttgacctgga actggatccg gcagtttcca 180

ES 2 540 802 T3

ggaaacaagc tggagtggat gggctacata agttatagtg gtaacactag gtacaacca 240
 5 tctctcaaaa gtcgaatctc tatcactcga gacacatcca agaaccaatt cttcctgcag 300
 ttgaattctg tgactattga ggacacagcc acatattact gtgtaacggc gggacgcggg 360
 tttccttatt ggggccaagg gactctggtc actgtctctg ca 402
 10 <210> 2
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 15 <400> 2
 20 Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Val
 1 5 10 15
 Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro
 20 25 30
 Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
 35 40 45
 Ser Asp Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu
 50 55 60
 Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 85 90 95
 40 Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ile Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
 100 105 110
 45 Tyr Cys Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125
 50 Leu Val Thr Val Ser Ala
 130
 55 <210> 3
 <211> 384
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 60 <400> 3
 atgggtgtcca cagctcagtt ccttgcatc ttgttgcttt ggtttccagg tgcaagatgt 60
 gacatcctga tgaccaatc tccatcctcc atgtctgtat ctctgggaga cacagtcagc 120
 atcacttgcc attcaagtca ggacattaac agtaatatag ggtggttgca gcagagacca 180
 65 gggaaatcat ttaagggcct gatctatcat ggaaccaact tggacgatga agttccatca 240
 aggttcagtg gcagtgatc tggagccgat tattctctca ccatcagcag cctggaatct 300

ES 2 540 802 T3

gaagattttg cagactatta ctgtgtacag tatgctcagt ttccgtggac gttcgggtgga 360
 5 ggcaccaagc tggaaatcaa acgt 384

<210> 4
 <211> 128
 <212> PRT
 10 <213> Mus musculus

<400> 4

Met Val Ser Thr Ala Gln Phe Leu Ala Phe Leu Leu Leu Trp Phe Pro
 15 1 5 10 15

Gly Ala Arg Cys Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser
 20 20 25 30

Val Ser Leu Gly Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp
 25 35 40 45

Ile Asn Ser Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ser Phe
 50 55 60

Lys Gly Leu Ile Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Glu Val Pro Ser
 30 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
 35 85 90 95

Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala
 40 100 105 110

Gln Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 45 115 120 125

<210> 5
 <211> 13
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> biotinilada en la posición 1

<400> 5

Leu Glu Glu Lys Lys Gly Asn Tyr Val Val Thr Asp His
 55 1 5 10

<210> 6
 <211> 13
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> biotinilada en la posición 13

<400> 6

ES 2 540 802 T3

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

5
 <210> 7
 <211> 6149
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> vector sintético

<400> 7

15 ctcgagagcg ggcagtgagc gcaacgcaat taatgtgagt tagctcactc attaggcacc 60
 ccaggcttta cactttatgc tcccggctcg tatgttggtg ggagattgtg agcggataac 120
 aatttcacac agaattcgtg aggctccggt gcccgtcagt gggcagagcg cacatcgccc 180
 20 acagtccccg agaagttggg gggagggggtc ggcaattgaa ccggtgccta gagaaggtgg 240
 cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc gcctttttcc cgaggggtgg 300
 25 ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc tttttcgcaa cggggttgcc 360
 gccagaacac aggtaagtgc cgtgtgtggt tcccgcgggc ctggcctctt tacgggttat 420
 ggcccttgcg tgccttgaat tacttccacg cccctggctg cagtacgtga ttcttgatcc 480
 30 cgagcttcgg gttggaagtg ggtgggagag ttcgaggcct tgcgcttaag gagccccttc 540
 gcctcgtgct tgagttgagg cctggcctgg gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggtg 600
 35 gcaccttcgc gcctgtctcg ctgctttcga taagtctcta gccatttaa atttttgatg 660
 acctgctgcg acgctttttt tctggcaaga tagtcttgta aatgcggggc aagatctgca 720
 cactggtatt tcggtttttg gggccgcggg cggcgacggg gcccgctcgt cccagcgcac 780
 40 atgttcggcg aggcggggccc tgcgagcgcg gccaccgaga atcggacggg gtagtctca 840
 agctggccgg cctgctctgg tgcctggcct cgcgccgccg tgtatcgccc cgccctgggc 900
 45 ggcaaggctg gcccggtcgg caccagttgc gtgagcggaa agatggccgc ttcccggccc 960
 tgctgcaggg agctcaaaat ggaggacgcg gcgctcggga gagcgggcgg gtgagtcacc 1020
 cacacaaagg aaaagggcct ttccgtctc agccgtcgtc tcatgtgact ccacggagta 1080
 50 ccgggcgccc tccaggcacc tcgattagtt ctcgagcttt tggagtacgt cgtctttagg 1140
 ttggggggag gggttttatg cgatggagtt tccccacact gagtgggtgg agactgaagt 1200
 55 taggccagct tggcacttga tgtaattctc cttggaattt gccctttttg agtttggatc 1260
 ttggttcatt ctcaagcctc agacagtggg tcaaagtttt tttcttccat ttcaggtgta 1320
 cgcgtctcgg gaagcttttag tttaaacgcc gccaccatgg tgtccacagc tcagttcctt 1380
 60 gcattcttgt tgctttgggt tccagggtgca agatgtgaca tcctgatgac ccaatctcca 1440
 tcctccatgt ctgtatctct gggagacaca gtcagcatca cttgccattc aagtcaggac 1500
 65 attaacagta atataggggtg gttgcagcag agaccagggg aatcatttaa gggcctgatc 1560
 tatcatggaa ccaacttggg cgatgaagtt ccatcaaggt tcagtggcag tggatctgga 1620

ES 2 540 802 T3

gccgattatt ctctcacat cagcagcctg gaatctgaag attttgcaga ctattactgt 1680
 gtacagcatg ctcagtttcc gtggacgttc ggtggaggca ccaagctgga aatcaaacgg 1740
 5 gtgagtggat ccatctggga taagcatgct gttttctgtc tgtccctaac atgccctgtg 1800
 attatgcgca aacaacacac ccaagggcag aactttgtta cttaaaccacc atcctgtttg 1860
 10 cttctttcct caggaactgt ggctgcacca tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag 1920
 cagttgaaat ctggaactgc ctctgtttgt tgcctgctga ataacttcta tcccagagag 1980
 gccaaagtac agtggaaagg ggataacgcc ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc 2040
 15 acagagcagg acagcaagga cagcacctac agcctcagca gcaccctgac gctgagcaaa 2100
 gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg 2160
 cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag tgttgagcta gaactaacta actaagctag 2220
 20 caacggtttc cctctagcgg gatcaattcc gcccccccc cctaacgtta ctggccgaag 2280
 ccgcttgaa taaggccggt gtgctgttct ctatatgtta ttttccacca tattgccgtc 2340
 25 ttttggcaat gtgagggccc ggaaacctgg ccctgtcttc ttgacgagca ttcctagggg 2400
 tctttccct ctcgcaaag gaatgcaagg tctgttgaat gtcgtgaagg aagcagttcc 2460
 tctggaagct tcttgaagac aaacaacgtc tgtagcgacc ctttgcaggc agcggaaacc 2520
 30 cccacctggc gacaggtgcc tctgcgcca aaagccacgt gtataagata cacctgcaaa 2580
 ggcggcaciaa cccagtgcc acgttgtgag ttggatagtt gtggaaagag tcaaattggct 2640
 35 ctctcaagc gtattcaaca aggggctgaa ggatgccag aaggtaacc attgtatggg 2700
 atctgatctg gggcctcggg gcacatgctt tacgtgtgtt tagtcgaggt taaaaaacgt 2760
 ctaggcccc cgaaccacgg ggacgtggtt ttcctttgaa aaacacgata ataccatggt 2820
 40 tgaacaagat ggattgcacg caggttctcc ggccgcttg gtggagaggc tattcggtca 2880
 tgactgggca caacagacia tcggctgctc tgatgccgcc gtgttccggc tgtcagcgca 2940
 45 ggggcgccc gttctttttg tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg aactgcagga 3000
 cgaggcagcg cggctatcgt ggctggccac gacgggcgtt ccttgcgag ctgtgctcga 3060
 cgttgtcact gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccgg ggcaggatct 3120
 50 cctgtcatct caccttgctc ctgccgagaa agtatccatc atggctgatg caatgcggcg 3180
 gctgcatacg cttgatccgg ctacctgcc attcgaccac caagcgaac atcgcatcga 3240
 55 gcgagcacgt actcggatgg aagccggtct tgtcgatcag gatgatctgg acgaagagca 3300
 tcaggggctc gcgccagccg aactgttcgc caggctcaag gcgcgcatgc ccgacggcga 3360
 ggatctcgtc gtgacctatg gcgatgcctg cttgccgaat atcatggtgg aaaatggccg 3420
 60 cttttctgga ttcacgact gtggccggct ggggtgtggc gaccgctatc aggacatagc 3480
 gttggctacc cgtgatattg ctgaagagct tggcggcgaa tgggctgacc gcttctcgt 3540
 65 gctttacggt atcgccgctc ccgattcgca gcgcatgcc ttctatgcc ttcttgacga 3600
 gttcttctga gtcgatcgac ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttcc 3660

ES 2 540 802 T3

caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg 3720
 gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcctt agcgcctcgt 3780
 5 cctttcgctt tcttccttc ctttctcgcc acgttcgccg gctttccccg tcaagctcta 3840
 aatcgggggc tccctttagg gttccgattt agtgctttac ggcacctcga ccccaaaaaa 3900
 10 cttgattagg gtgatggttc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt ttttcgcctt 3960
 tgacgttggg gtccacgttc tttaatagtg gactcttggt ccaaactgga acaacactca 4020
 accctatctc ggtctattta taagggattt tgccgatttc ggctatttgg ttaaaaaatg 4080
 15 agctgattta acaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgctta caatttaggt 4140
 ggcacttttc ggggaaatgt gcgcggaacc cctatatttg tttatttttc taaatacatt 4200
 caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa 4260
 20 ggaagagtat gagtattcaa ctttccgtg tcgcccttat tccctttttt gcggcatttt 4320
 gccttactgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaagatcagt 4380
 25 tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc cttgagagtt 4440
 ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg 4500
 30 tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggtcg ccgcatacac tattctcaga 4560
 atgacttggg tgagtactca ccagtcacag aaaagcatat tacggatggc atgacagtaa 4620
 gagaattatg cagtgctgcc ataaccatga gtgataaacac tgcggccaac ttacttctga 4680
 35 caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa 4740
 ctcgccttga tcgttgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca 4800
 ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaaact attaactggc gaactactta 4860
 40 ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac 4920
 ttctgcgctc ggcccttccg gctggctggg ttattgctga taaatctgga gccgggtgagc 4980
 45 gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag 5040
 ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag atcgctgaga 5100
 taggtgcctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca tatatacttt 5160
 50 agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc ctttttgata 5220
 atctcatgac caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag 5280
 55 aaaagatcaa aggatgttct tgagatcctt tttttctgca cgtaatctgc tgcttgcaaa 5340
 caaaaaacca ccgctaccag cgggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt 5400
 60 tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagttagacc 5460
 gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata 5520
 cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag 5580
 65 acgatagtta ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc 5640
 cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaaag 5700

ES 2 540 802 T3

	cgccacgctt cccgaagga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtcggaac	5760
	aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg	5820
5	gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct	5880
	atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggccttttg	5940
10	tcacatgttc tttcctgcgt tatcccctga ttctgtggat aaccgtatta ccgcctttga	6000
	gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga	6060
	agcgggaagag cgcccaatac gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg	6120
15	caggtatcac gaggcccttt cgtcttcac	6149
20	<210> 8 <211> 6625 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> vector sintético	
30	<400> 8 ctcgagagcg ggcagtgagc gcaacgcaat taatgtgagt tagctcactc attaggcacc	60
	ccaggcttta cactttatgc tcccggctcg tatgttgtgt ggagatttg agcggataac	120
	aatttcacac agaattcgtg aggtccggg gcccgtcagt gggcagagcg cacatcgccc	180
	acagtccccg agaagttggg gggagggggtc ggcaattgaa ccggtgccta gagaaggtgg	240
35	cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc gcctttttcc cgaggggtggg	300
	ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc tttttcgcaa cgggtttgcc	360
40	gccagaacac aggtaagtgc cgtgtgtggt tcccgcgggc ctggcctctt tacgggttat	420
	ggcccttgcg tgccttgaat tacttccacg cccctggctg cagtacgtga ttcttgatcc	480
	cgagcttcgg gttggaagtg ggtgggagag ttcgaggcct tgcgcttaag gagccccttc	540
45	gcctcgtgct tgagttgagg cctggcctgg gcgctggggc cgccgcgtgc gaatctggtg	600
	gcaccttcgc gcctgtctcg ctgctttcga taagtctcta gccatttaa atttttgatg	660
50	acctgctgcg acgctttttt tctggcaaga tagtcttgta aatgcggggc aagatctgca	720
	cactggtatt tcggtttttg gggccgcggg cggcgacggg gcccgctcgt cccagcgcac	780
	atgttcggcg aggcggggcc tgcgagcgcg gccaccgaga atcggacggg gtagtctca	840
55	agctggcccg cctgctctgg tgcctggcct cgcgccgccg tgtatcgccc cgccctgggc	900
	ggcaaggctg gcccggtcgg caccagttgc gtgagcggaa agatggccgc ttcccggccc	960
60	tgctgcaggg agctcaaaat ggaggacgcg gcgctcggga gagcgggcgg gtgagtcacc	1020
	cacacaaagg aaaagggcct ttccgtctc agccgtcgtc tcatgtgact ccacggagta	1080
	ccgggcccgg tccaggcacc tcgattagtt ctcgagcttt tggagtacgt cgtcttttagg	1140
65	ttggggggag gggttttatg cgatggagtt tccccacact gagtgggtgg agactgaagt	1200
	taggccagct tggcacttga tgtaattctc cttggaattt gccctttttg agtttgatc	1260

ES 2 540 802 T3

	ttggttcatt	ctcaagcctc	agacagtgg	tcaaagtttt	tttcttccat	ttcaggtgta	1320
	cgcgtctcgg	gaagctttag	tttaaacgcc	gccacatga	gagtgtgat	tcttttgtgg	1380
5	ctgttcacag	cctttcctgg	tgtcctgtct	gatgtgcagc	ttcaggagtc	gggacctagc	1440
	ctggtgaaac	cttctcagac	tctgtccctc	acctgcactg	tcactgggcta	ctcaatcacc	1500
10	agtgattttg	cctggaactg	gatccggcag	tttccaggaa	acaagctgga	gtggatgggc	1560
	tacataagtt	atagtggtaa	cactaggtac	aacccatctc	tcaaaagtcg	aatctctatc	1620
	actcgagaca	catccaagaa	ccaattcttc	ctgcagttga	attctgtgac	tattgaggac	1680
15	acagccacat	attactgtgt	aacggcgggg	cgcgggtttc	cttattgggg	ccaagggact	1740
	ctggtcactg	tctctgcaca	gtgagtggat	cctctgcgcc	tgggccagc	tctgtcccac	1800
20	accgcggtca	catggcacca	cctctcttgc	agcctccacc	aagggcccat	cggctcttccc	1860
	cctggcacc	tcctccaaga	gcacctctgg	gggcacagcg	gccctgggct	gcctgggtaa	1920
	ggactacttc	cccgaaccgg	tgacggtgtc	gtggaactca	ggcgccctga	ccagcggcgt	1980
25	gcacaccttc	ccggctgtcc	tacagtcctc	aggactctac	tccctcagca	gcgtgggtgac	2040
	cgtgccctcc	agcagcttgg	gcacccagac	ctacatctgc	aacgtgaatc	acaagcccag	2100
30	caacaccaag	gtggacaaga	aagttgagcc	caaatcttgt	gacaaaactc	acacatgccc	2160
	accgtgcca	gcacctgaac	tcctgggggg	accgtcagtc	ttcctcttcc	ccccaaaacc	2220
	caaggacacc	ctcatgatct	cccggacccc	tgaggtcaca	tgctgtgtgg	tggacgtgag	2280
35	ccacgaagac	cctgaggtca	agttcaactg	gtacgtggac	ggcgtggagg	tgcataacgc	2340
	caagacaaag	ccgcgggagg	agcagtacaa	cagcacgtac	cgggtgggtca	gcgtcctcac	2400
40	cgtcctgcac	caggactggc	tgaatggcaa	ggagtacaag	tgcaaggctt	ccaacaaagc	2460
	cctcccagcc	cccacgaga	aaacccatctc	caaagccaaa	gggcagcccc	gagaaccaca	2520
	ggtgtacacc	ctgccccat	cccgggagga	gatgaccaag	aaccagggtca	gcctgacctg	2580
45	cctgggtcaaa	ggcttctatc	ccagcgacat	cgccgtggag	tgggagagca	atgggcagcc	2640
	ggagaacaac	tacaagacca	cgctcccgt	gctggactcc	gacggctcct	tcttctctta	2700
50	cagcaagctc	accgtggaca	agagcaggtg	gcagcagggg	aacgtcttct	catgctccgt	2760
	gatgcatgag	gctctgcaca	accactacac	gcagaagagc	ctctccctgt	ctccgggtaa	2820
	atgagctaga	aactaactaa	gctagcaacg	gtttccctct	agcgggatca	attccgcccc	2880
55	ccccccctaa	cgttactggc	cgaagccgct	tggataaagg	ccggtgtgcg	tttgtctata	2940
	tgttattttc	caccatattg	ccgtcttttg	gcaatgtgag	ggcccggaaa	cctggccctg	3000
60	tcttcttgac	gagcattcct	aggggtcttt	cccctctcgc	caaaggaatg	caaggtctgt	3060
	tgaatgtcgt	gaaggaagca	gttcctctgg	aagcttcttg	aagacaaaca	acgtctgtag	3120
	cgaccctttg	caggcagcgg	aacccccac	ctggcgacag	gtgcctctgc	ggccaaaagc	3180
65	cacgtgtata	agatacacct	gcaaaggcgg	cacaaccca	gtgccacgtt	gtgagttgga	3240
	tagttgtgga	aagagtcaaa	tggctctcct	caagcgtatt	caacaagggg	ctgaaggatg	3300

ES 2 540 802 T3

cccagaaggt accccattgt atgggatctg atctggggcc tcggtgcaca tgctttacgt 3360
 gtgttttagtc gaggttaaaa aacgtctagg cccccgaac cacggggacg tggttttcct 3420
 5 ttgaaaaaca cgataatacc atggttcgac cattgaactg catcgtcgcc gtgtcccaaa 3480
 atatggggat tggcaagaac ggagacctac cctggcctcc gctcaggaac gagttcaagt 3540
 10 acttccaaag aatgaccaca acctcttcag tggaaagtaa acagaatctg gtgattatgg 3600
 gtaggaaaac ctggttctcc attcctgaga agaatcgacc tttaaaggac agaattaatg 3660
 gttcgatata gttctcagta gagaactcaa agaaccacca cgaggagctc attttcttgc 3720
 15 caaaagtttg gatgatgcct taagacttat tgaacaaccg gaattggcaa gtaaagtaga 3780
 catggtttgg atagtcggag gcagttctgt ttaccaggaa gccatgaatc aaccaggcca 3840
 cctcagactc tttgtgacaa ggatcatgca ggaatttgaa agtgacacgt ttttccaga 3900
 20 aattgatttg gggaaatata aacttctccc agaataccca ggcgtcctct ctgaggcca 3960
 ggaggaaaaa ggcatacaagt ataagtttga agtctacgag aagaaagact aacaggaaga 4020
 25 tgctttcaag ttctctgctc ccctcctaaa gctatgcatt ttataagac catgggactt 4080
 ttgctggctg atcgacctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc cttcccaac 4140
 agttgcgcag cctgaatggc gaatgggacg cgccctgtag cggcgcatta agcgcggcgg 4200
 30 gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgccctagcg cccgctcctt 4260
 tcgctttctt cccttccttt ctcgccacgt tcgccggctt tccccgtaa gctctaaatc 4320
 35 gggggctccc tttagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg 4380
 attaggggtga tggttcacgt agtgggcat cgccctgata gacggttttt cgcctttgac 4440
 gttggagtcc acgttcttta atagtgact cttgttccaa actggaacaa cactcaacc 4500
 40 tatctcggtc tatttataag ggattttgcc gatttcggcc tattggtaa aaaatgagct 4560
 gatttaacaa aatttaacgc gaattttaac aaaatattaa cgcttacaat ttaggtggca 4620
 45 cttttcgggg aatgtgcmc ggaaccctta tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa 4680
 tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa 4740
 gagtatgagt attcaacatt tccgtgcmc cttattccc tttttgcmc cattttgcct 4800
 50 tactgttttt gctcaccag aaacgctggg gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg 4860
 tgcacgagtg ggttacatcg aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg 4920
 55 ccccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt 4980
 atcccgtatt gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga 5040
 cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa gcatattacg gatggcatga cagtaagaga 5100
 60 attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcm gccaaacttac ttctgacaac 5160
 gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt ttgcacaac atgggggatc atgtaactcm 5220
 65 ccttgatcmg tgggaaccgm agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac 5280
 gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcm caaactatta actggcgaac tacttactct 5340

ES 2 540 802 T3

agcttcccgg caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct 5400
 gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg 5460
 5 gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgta tcgtagttat 5520
 ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg 5580
 10 tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagt tactcatata tactttagat 5640
 tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag gatctagggtg aagatccttt ttgataatct 5700
 catgacaaa atcccttaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa 5760
 15 gatcaaagga tgttcttgag atcctttttt tctgcacgta atctgctgct tgcaaacaaa 5820
 aaaccaccgc taccagcggg ggtttgtttg ccggatcaag agctaccaac tctttttccg 5880
 aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg tccttctagt gtagccgtag 5940
 20 ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcgtct gctaactctg 6000
 ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta ccgggttggga ctcaagacga 6060
 25 tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc 6120
 ttggagcгаа cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc 6180
 acgcttcccg aaggagaaaa ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga 6240
 30 gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac gcctggtatc tttatagtcc tgtcggggtt 6300
 cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt caggggggcg gagcctatgg 6360
 35 aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttctggcct tttgctggcc tttgctcac 6420
 atgttctttc ctgctttatc ccctgattct gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga 6480
 gctgataccg ctcgccgag ccgaacgacc gagcgcagcg agtcagtgag cgaggaagcg 6540
 40 gaagagcgcc caatacgcaa accgcctctc cccgcgcggt ggccgattca ttaatgcagg 6600
 tatcacgagg ccctttcgtc ttcac 6625

45 <210> 9
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> vector sintético

55 <400> 9

Met Val Ser Thr Ala Gln Phe Leu Ala Phe Leu Leu Leu Trp Phe Pro
 1 5 10 15

60 Gly Ala Arg Cys Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser
 20 25 30

65 Val Ser Leu Gly Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp
 35 40 45

Ile Asn Ser Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ser Phe

ES 2 540 802 T3

Ser Asp Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu
 50 55 60
 5
 Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro
 65 70 75 80
 10 Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 85 90 95
 15 Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ile Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
 100 105 110
 20 Tyr Cys Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125
 Leu Val Thr Val Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 130 135 140
 25 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 145 150 155 160
 30 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 165 170 175
 35 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 180 185 190
 40 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Tyr Ser Val Pro Ser Ser Ser
 195 200 205
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 210 215 220
 45 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 225 230 235 240
 50 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 245 250 255
 55 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 260 265 270
 60 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 275 280 285
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 290 295 300
 65 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 305 310 315 320

ES 2 540 802 T3

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 325 330 335
 5 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 340 345
 10 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 355 360 365
 15 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 370 375 380
 20 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 385 390 395 400
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 405 410 415
 25 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 420 425 430
 30 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 435 440 445
 35 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460
 <210> 11
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 11
 45 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 50 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30
 55 Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45
 60 Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 65 Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80
 65 Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ile Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

ES 2 540 802 T3

Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

5 Thr Val Ser Ala
115

10 <210> 12
<211> 108
<212> PRT
<213> Mus musculus

15 <400> 12

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

20 Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn
20 25 30

25 Ile Gly Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile
35 40 45

30 Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Glu Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65 70 75 80

35 Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp
85 90 95

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

45 <210> 13
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> sintética

<400> 13

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

60 <210> 14
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> sintética

65 <400> 14

Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys

ES 2 540 802 T3

	1		5		10		15	
5	<210>	15	<211>	6	<212>	PRT	<213>	Mus musculus
	<400>	15						
10	Ser	Asp	Phe	Ala	Trp	Asn		
	1				5			
15	<210>	16	<211>	16	<212>	PRT	<213>	Mus musculus
	<400>	16						
20	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Asn	Thr
	1				5			Arg
								Tyr
								10
								Asn
								Pro
								Ser
								Leu
								Lys
								15
								Ser
25	<210>	17	<211>	9	<212>	PRT	<213>	Mus musculus
	<400>	17						
30	Val	Thr	Ala	Gly	Arg	Gly	Phe	Pro
	1				5			Tyr
35	<210>	18	<211>	11	<212>	PRT	<213>	Mus musculus
	<400>	18						
40	His	Ser	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Ser
	1				5			Asn
								Ile
								10
								Gly
45	<210>	19	<211>	7	<212>	PRT	<213>	Mus musculus
	<400>	19						
50	His	Gly	Thr	Asn	Leu	Asp	Asp	
	1				5			
55	<210>	20	<211>	9	<212>	PRT	<213>	Mus musculus
	<400>	20						
60	Val	Gln	Tyr	Ala	Gln	Phe	Pro	Trp
	1				5			Thr
65								

ES 2 540 802 T3

<210> 21
 <211> 348
 <212> ADN
 5 <213> Mus musculus

 <400> 21
 gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctagc ctggtgaaac cttctcagtc tctgtccctc 60
 10 acctgcactg tctactggcta ctcaatcacc agtgactatg cctggaactg gatccggcag 120
 tttccaggaa acaaaactgga gtggatgggc tacataagtt acagtgctaa cactaggtac 180
 aaccatctc tcaaaagtcg aatctctatc actcgagaca catccaagaa ccaattcttc 240
 15 ctgcagttga attctgtgac tactgaggac acagccacat attactgtgc aacggcggga 300
 cgcggtttc cttactgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgca 348

 20
 <210> 22
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 25
 <400> 22

 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 30 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30
 35 Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40
 40 Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Ala Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 45 Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 50 Ala Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 55 Thr Val Ser Ala
 115
 60 <210> 23
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 65 <400> 23
 Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
 1 5

ES 2 540 802 T3

5 <210> 24
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 24
 10 Tyr Ile Ser Tyr Ser Ala Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 15 <210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 25
 20 Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr
 1 5
 25 <210> 26
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 30 <400> 26
 gacatcctga tgaccaatc tccatcctcc atgtctctat ctctgggaga cacagtcagt 60
 atcacttgcc attcaagtca ggacattaac agtaatatag ggtggttgca gcagaaacca 120
 35 gggaaatcat ttaagggcct gatctatcat ggaaccaact tggacgatgg agttccatca 180
 aggttcagtg gcagtgatc tggagccgat tatttctca ccatcagcag cctggaatct 240
 40 gaagattttg tagactatta ctgtgtacag tatggtcagt ttccgtggac gttcgggtgga 300
 ggcaccaagc tggaaatcaa acgg 324
 45 <210> 27
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 27
 50 Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Leu Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 55 Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn
 20 25 30
 60 Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile
 35 40 45
 Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 65 Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
 65 70 75 80

ES 2 540 802 T3

Asp Val Gln Leu Gln Gly Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 5 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30
 10 Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45
 15 Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 20 Arg Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 25 Ala Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 30 Thr Val Ser Ala
 115
 35 <210> 33
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 40 <400> 33
 Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
 1 5
 45 <210> 34
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 50 <400> 34
 Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser
 1 5 10 15
 55 <210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 60 <400> 35
 Ala Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr
 1 5
 65 <210> 36
 <211> 322

ES 2 540 802 T3

<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 36
 5 gacatcctga tgaccaatc tccatcctcc atgtctgtgt ctctgggaga cacagtcaac 60
 atcacttgcc attcaagtca ggacattaac agtaatatag ggtggttgca gcagaaacca 120
 10 gggaaatcat ttaagggcct gatctatcat ggaaccaact tggacgatgg agttccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tggagccgat tattctctca ccatcagcag cctggaatct 240
 gaggattttg cagactatta ctgtgtacag tatggtcagt ttccgtggac gttcgggtgga 300
 15 ggcaccaagc tggaaatcaa ac 322

<210> 37
<211> 108
 20 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 37
 25 Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 30 Asp Thr Val Asn Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn
 20 25 30
 35 Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile
 35 40 45
 40 Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 45 Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
 65 70 75 80
 50 Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Gly Gln Phe Pro Trp
 85 90 95
 55 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 38
<211> 11
 55 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 38
 60 His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn Ile Gly
 1 5 10

<210> 39
<211> 7
 65 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 540 802 T3

<220>
 <223> sintética

<400> 39

5 His Gly Thr Asn Leu Asp Asp
 1 5

10 <210> 40
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15 <400> 40

Val Gln Tyr Gly Gln Phe Pro Trp Thr
 1 5

20 <210> 41
 <211> 11891
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> vector sintético

<400> 41

30 aagcttgccg ccaccatgga ttggacctgg cgcatttctt ttctggtagc agccgccaca 60
 ggtaaggggc tgccaaatcc cagtgaggag gaagggatcg aaggtcacca tcgaagccag 120
 tcaccagtg aagggggctt ccatccactc ctgtgtcttc tctacaggtg tccacagcca 180
 35 ggtgcagctc caagagagtg gacctgggct tgtcaagccg agtcaaactt tgtccctaac 240
 atgtactgtg tccggatact ctatctcatc agatthttgcg tgggaattgga taaggcagcc 300
 40 accagggaaa ggtttagaat ggatgggcta catatcatac tctgggaaca ccagatatca 360
 accttctctg aaaagccgga tcacaatctc aagggacacg tcgaagaatc agttcttctc 420
 gaaactgaac tccgttacag ccgcagacac agcaacatat tactgctgaa ccgctggcag 480
 45 aggcttcccc tattggggac agggcacctc agtgacagtg agcagcggta agatggcaca 540
 ccgtggccgg cctctgcgcc tgggcccagc tctgtcccac accgcggtca catggcacct 600
 50 tttctcttcc agcctccacc aagggcccca gcgtgttccc cctggcccc agcagcaaga 660
 gcaccagcgg cggcacagcc gccctgggct gcctggtgaa ggactacttc cccgagcccc 720
 tgaccgtgag ctggaacagc ggagccctga cctccggcgt gcacaccttc cccgccgtgc 780
 55 tgcagagcag cggcctgtac agcctgagca gcgtgggtgac cgtgcccagc agcagcctgg 840
 gcaccagac ctacatctgc aacgtgaacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga 900
 60 aggtggagcc caagagctgc gacaagacct acacctgccc cccctgcccc gccccagagc 960
 tgctgggccc accctccgtg ttctgttccc ccccaagcc caaggacacc ctgatgatca 1020
 gcaggacccc cgaggtgacc tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaggac ccagaggtga 1080
 65 agttcaattg gtatgtggac ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag cccagagaag 1140
 agcagtacaa cagcacctac aggggtgggtg ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc 1200

ES 2 540 802 T3

	tgaacggcaa	ggaatacaaa	tgcaaggtct	ccaacaaggc	cctgccagcc	cccatcgaaa	1260
5	agaccatcag	caaggccaag	ggccagccac	gggagcccca	ggtgtacacc	ctgccccct	1320
	cccgggacga	gtgcaccaag	aaccaggtgt	ccctgacctg	tctggtgaag	ggcttctacc	1380
	ccagcgacat	cgccgtggag	tgggagagca	acggccagcc	cgagaacaac	tacaagacca	1440
10	cccccccagt	gctggacagc	gacggcagct	tcttcctgta	cagcaagctg	accgtggaca	1500
	agagcaggtg	gcagcagggc	aacgtgttca	gctgcagcgt	gatgcacgag	gccctgcaca	1560
	accactacac	ccagaagagc	ctgagcctgt	ccccggcaa	gtgatgacga	cgcggccgtg	1620
15	cggacgaccg	aattcattga	tcataatcag	ccataccaca	ttttagagag	ttttacttgc	1680
	tttaaaaaac	ctcccacacc	tccccctgaa	cctgaaacat	aaaatgaatg	caattgttgt	1740
20	tgттаacttg	tttattgcag	cttataatgg	ttacaaataa	agcaatagca	tcacaaatth	1800
	cacaaataaa	gcattttttt	cactgcattc	tagttgtggt	ttgtccaaac	tcatcaatgt	1860
25	atcttatcat	gtctggcggc	cgccgatatt	tgaaaatatg	gcatattgaa	aatgtcgccg	1920
	atgtgagttt	ctgtgtaact	gatatcgcca	tttttccaaa	agtgattttt	gggcatacgc	1980
	gatatctggc	gatagcgctt	atatcgttta	cgggggatgg	cgatagacga	ctttggtgac	2040
30	ttgggcgatt	ctgtgtgtcg	caaatatcgc	agtttcgata	taggtgacag	acgatatgag	2100
	gctatatcgc	cgatagaggc	gacatcaagc	tggcacatgg	ccaatgcata	tcgatctata	2160
	cattgaatca	atattggcca	ttagccatat	tattcattgg	ttatatagca	taaatcaata	2220
35	ttggctattg	gccattgcat	acgttgtatc	catatcataa	tatgtacatt	tatattggct	2280
	catgtccaac	attaccgcca	tgttgacatt	gattattgac	tagttattaa	tagtaatcaa	2340
40	ttacggggtc	attagttcat	agcccatata	tggagttccg	cgttacataa	cttacggtaa	2400
	atggcccgcc	tggctgaccg	cccaacgacc	cccgccatt	gacgtcaata	atgacgtatg	2460
45	ttcccatagt	aacgccaata	gggactttcc	attgacgtca	atgggtggag	tatttacggt	2520
	aaactgcca	cttggcagta	catcaagtgt	atcatatgcc	aagtacgccc	cctattgacg	2580
	tcaatgacgg	taaatggccc	gcctggcatt	atgcccagta	catgacctta	tgggactttc	2640
50	ctacttggca	gtacatctac	gtattagtca	tcgctattac	catggtgatg	cggttttggc	2700
	agtacatcaa	tgggcgtgga	tagcggtttg	actcacgggg	atttccaagt	ctccacccca	2760
55	ttgacgtcaa	tgggagtttg	ttttggcacc	aaaatcaacg	ggactttcca	aaatgtcgta	2820
	acaactccgc	cccattgacg	caaatgggcg	gtaggcgtgt	acggtgggag	gtctatataa	2880
	gcagagctcg	tttagtgaac	cgtcagatcg	cctggagacg	ccatccacgc	tgttttgacc	2940
60	tccatagaag	acaccgggac	cgatccagcc	tccgcggccg	ggaacggtgc	attggaacgc	3000
	ggattccccg	tgccaagagt	gacgtaagta	ccgcctatag	agtctatagg	cccaccccct	3060
65	tggcttctta	tgcatgctat	actgtttttg	gcttggggtc	tatacacccc	cgcttctca	3120
	tgttataggt	gatggtatag	cttagcctat	agggtggggt	tattgaccat	tattgaccac	3180
	tcccctattg	gtgacgatac	tttccattac	taatccataa	catggctctt	tgccacaact	3240

ES 2 540 802 T3

	ctctttattg	gctatatgcc	aatacactgt	ccttcagaga	ctgacacgga	ctctgtattt	3300
5	ttacaggatg	gggtctcatt	tattatttac	aaattcacat	atacaacacc	accgtcccca	3360
	gtgcccgcag	tttttattaa	acataacgtg	ggatctccac	gcgaatctcg	ggtacgtggt	3420
	ccggacatgg	gctcttctcc	ggtagcggcg	gagcttctac	atccgagccc	tgctcccatg	3480
10	cctccagcga	ctcatggtcg	ctcggcagct	ccttgctcct	aacagtggag	gccagactta	3540
	ggcacagcac	gatgcccacc	accaccagtg	tgccgcacaa	ggccgtggcg	gtagggtagt	3600
	tgtctgaaaa	tgagctcggg	gagcgggctt	gcaccgctga	cgcat ttgga	agacttaagg	3660
15	cagcggcaga	agaagatgca	ggcagctgag	ttgttggtt	ctgataagag	tcagaggtaa	3720
	ctcccgttgc	ggtgctgtta	acggtggagg	gcagtgtagt	ctgagcagta	ctcgttgctg	3780
20	ccgcgcgcgc	caccagacat	aatagctgac	agactaacag	actgttcctt	tccatgggtc	3840
	ttttctgcag	tcaccgtcct	tgacacgaag	cttgccgcca	ccatggattg	gacttggaga	3900
	atactgtttc	ttgtagcagc	cgcaacaggt	aaggggctgc	caaatcccag	tgaggaggaa	3960
25	gggatcgaag	gtgaccatcg	aagccagtca	agggggcgga	ccgcttccat	ccactcctgt	4020
	gtcttctcta	caggtgttca	cagtgatatt	cagatgactc	agagtccatc	cagcatgtca	4080
30	gtctccgtgg	gagatagggg	gacgataacc	tgtcattcaa	gccaagacat	caactccaat	4140
	attggatggc	tccaacagaa	gcctggtaag	tccttcaaag	gactaatcta	tcacggaaca	4200
	aacttgacg	acggcgtgcc	atcgagattt	tcagggctctg	gcagcgggac	cgactataca	4260
35	ctgaccatct	ctagcttaca	accagaggac	tttgccacat	actactgcgt	ccagtacgct	4320
	cagttcccct	ggacattcgg	cggcggcaca	aaactggaaa	tcaaacgtga	gtagcgggtc	4380
40	gttaattaa	gatccttcta	aactctgagg	gggtcggatg	acgtggccat	tgttacttaa	4440
	acaccatcct	gtttgcttct	ttcctcagga	accgtcgcag	ctccctccgt	gttcatcttc	4500
	ccccatccg	acgagcaact	gaagtcaggc	acagcctccg	tggtgtgcct	ccttaataac	4560
45	ttttaccaa	gagaggccaa	agtcagtg	aaagtggaca	acgcactaca	gagcgggaac	4620
	tctcaggaaa	gcgtgacaga	gcaggactca	aaagattcaa	catacagcct	atcttctacc	4680
50	ctgacactgt	caaaagctga	ttatgaaaag	cacaaagtat	atgcctgtga	agtaactcat	4740
	cagggactca	gcagccctgt	cactaaaagt	tttaatagag	gcgaatgctg	ataagcggcc	4800
	gtgcgacga	ccgaattcat	tgatcataat	cagccatacc	acattttag	aggttttact	4860
55	tgctttaaaa	aacctcccac	acctcccct	gaacctgaaa	cataaaatga	atgcaattgt	4920
	tgttgttaac	ttgtttattg	cagcttataa	tggttacaaa	taaagcaata	gcatcacaaa	4980
60	tttcacaaat	aaagcatttt	tttactgca	ttctagttgt	ggtttgtcca	aactcatcaa	5040
	tgtatcttat	catgtctgga	tcctctacgc	cggacgcac	gtggccggca	tcaccggcgc	5100
	cacaggtgcg	gttgctggcg	cctatatcgc	cgacatcacc	gatggggaag	atcgggctcg	5160
65	ccacttcggg	ctcatgagcg	cttgtttcgg	cgtgggtatg	gtggcaggcc	ccgtggccgg	5220
	gggactgttg	ggcgccatct	ccttgcatgc	accattcctt	gcggcggcgg	tgctcaacgg	5280

ES 2 540 802 T3

cctcaaccta ctactgggct gcttcctaataat gcaggagtcg cataagggag agcgtcgacc 5340
 5 tcggggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa 5400
 tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc 5460
 ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg gatacctgtc 5520
 10 cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag 5580
 ttcgggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga 5640
 ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccgtaagac acgacttatc 5700
 15 gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac 5760
 agagtctctg aagtgggtggc ctaactacgg ctacactaga agaacagtat ttggtatctg 5820
 20 cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat ccggcaaaaa 5880
 aaccaccgct ggtagcgggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa 5940
 25 aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacgggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa 6000
 ctcacgttaa gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt 6060
 aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag 6120
 30 ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat 6180
 agttgcctga ctccccgtcg tntagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc 6240
 35 cagtgtgca atgataccgc gagaccacg ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa 6300
 ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggtcctgca actttatccg cctccatcca 6360
 gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa 6420
 40 cgttgttgcc attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggtg tggcttcatt 6480
 cagctccggt tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc 6540
 45 ggtagctcc ttcggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgag tgttatcact 6600
 catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc 6660
 tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg 6720
 50 ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct 6780
 catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc 6840
 55 cagttcgatg taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag 6900
 cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aatgccgca aaaaagggaa taagggcgac 6960
 acggaaatgt tgaatactca tactcttctt ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg 7020
 60 ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac aataggggt 7080
 tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac 7140
 65 attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gccctgatgg ctctttgagg caccatcgt 7200
 tcgtaatggt ccgtggcacc gaggacaacc ctcaagagaa aatgtaatca cactggctca 7260
 ccttcgggtg ggcctttctg cgtttataag gagacacttt atgtttaaga aggttggtaa 7320

ES 2 540 802 T3

attccttgcg gctttggcag ccaagctaga tccggctgtg gaatgtgtgt cagttagggg 7380
 5 gtggaaagtc cccaggctcc ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt 7440
 cagcaaccag gtgtggaaag tccccaggct ccccgagcagg cagaagtatg caaagcatgc 7500
 atctcaatta gtcagcaacc atagtccccg ccctaactcc gcccatcccg cccctaactc 7560
 10 cgcccagttc cgcccattct ccgccccatg gctgactaat tttttttatt tatgcagagg 7620
 ccgaggccgc ctcggcctct gagctattcc agaagtagtg aggaggcttt tttggaggcc 7680
 taggcTTTTg caaaaagcta gcttggggcc accgctcaga gcaccttcca ccatggccac 7740
 15 ctgagcaagt tcccacttga acaaaaacat caagcaaatg tacttgtgcc tgccccaggg 7800
 tgagaaagtc caagccatgt atatctgggt tgatggtact ggagaaggac tgcgctgcaa 7860
 20 aaccgcacc ctggactgtg agcccaagtg tgtagaagag ttacctgagt ggaattttga 7920
 tggctctagt acctttcagt ctgagggctc caacagtgac atgtatctca gccctgttgc 7980
 catgtttcgg gacccttcc gcagagatcc caacaagctg gtgttctgtg aagttttcaa 8040
 25 gtacaaccgg aagcctgcag agaccaatth aaggcactcg tgtaaacgga taatggacat 8100
 ggtgagcaac cagcaccctt ggtttggaaat ggaacaggag tatactctga tgggaacaga 8160
 30 tgggcaccct tttggttggc cttccaatgg ctttcctggg cccaaggctc cgtattactg 8220
 tgggtgtggc gcagacaaag cctatggcag ggatatcgtg gaggctcact accgcgcctg 8280
 cttgtatgct ggggtcaaga ttacaggaac aaatgctgag gtcatgcctg cccagtggga 8340
 35 actcceaata ggaccctgtg aaggaatccg catgggagat catctctggg tggcccgttt 8400
 catcttgcac cgagtatgtg aagacttttg ggtaaatagca acctttgacc ccaagcccat 8460
 40 tcctgggaac tggaatggtg caggctgcca taccaacttt agcaccaagg ccatgcggga 8520
 ggagaatggt ctgaagcaca tcgaggaggc catcgagaaa ctaagcaagc ggcaccggta 8580
 ccacattcga gcctacgatc ccaagggggg cctggacaat gcccggtgct tgactggggt 8640
 45 ccacgaaacg tccaacatca acgacttttc tgctgggtgc gccaatcgca gtgccagcat 8700
 ccgcattccc cggactgtcg gccaggagaa gaaaggttac tttgaagacc gcggcccctc 8760
 50 tgccaattgt gaccctttg cagtgcacaga agccatcgtc cgcacatgcc ttctcaatga 8820
 gactggcgac gagcccttcc aatacaaaaa ctaattagac tttgagtgat cttgagcctt 8880
 tcctagttca tcccaccccg cccagagag atctttgtga aggaacctta cttctgtggt 8940
 55 gtgacataat tggacaaact acctacagag atttaaagct ctaaggtaaa tataaaattt 9000
 ttaagtgtat aatgtgttaa actactgatt ctaattgttt gtgtatttta gattccaacc 9060
 60 tatggaactg atgaatggga gcagtgggtg aatgccttta atgaggaaaa cctgttttgc 9120
 tcagaagaaa tgccatctag tgatgatgag gctactgctg actctcaaca ttctactcct 9180
 ccaaaaaaga agagaaagggt agaagacccc aaggactttc cttcagaatt gctaagtttt 9240
 65 ttgagtcacg ctgtgttttag taatagaact cttgcttgct ttgctattta caccacaaag 9300
 gaaaaagctg cactgctata caagaaaatt atggaaaaat attctgtaac ctttataagt 9360

ES 2 540 802 T3

5 aggcataaca gttataatca taacatactg ttttttctta ctccacacag gcatagagtg 9420
 tctgctatta ataactatgc tcaaaaattg tgtaccttta gctttttaat ttgtaaaggg 9480
 10 gttaataagg aatatttgat gtatagtgcc ttgactagag atcataatca gccataccac 9540
 atttgtagag gttttacttg ctttaaaaaa cctccacac ctccccctga acctgaaaca 9600
 15 taaaatgaat gcaattggtg ttgttaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata 9660
 aagcaatagc atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt ctagtgtggtg 9720
 20 tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttatca tgtctggatc tagcttcgtg tcaaggacgg 9780
 tgactgcagt gaataataaa atgtgtggtt gtccgaaata cgcgttttga gatttctgtc 9840
 gccgactaaa ttcattgctgc gcgatagtggt tgtttatcgc cgatagagat ggcgatattg 9900
 25 gaaaaatcga tatttgaaaa tatggcatat tgaaaatgtc gccgatgtga gtttctgtgt 9960
 aactgatatc gccatttttc caaaagtgat ttttgggcat acgcgatatc tggcgatagc 10020
 30 gcttatatcg tttacggggg atggcgatag acgactttgg tgacttgggc gattctgtgt 10080
 gtcgcaaata tcgcagtttc gatataggtg acagacgata tgaggctata tcgccgatag 10140
 aggcgacatc aagctggcac atggccaatg catatcgatc tatacattga atcaatattg 10200
 35 gccattagcc atattattca ttggttatat agcataaatc aatattggct attggccatt 10260
 gcatacgttg tatccatatc ataatatgta catttatatt ggctcatgtc caacattacc 10320
 gccatgttga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattagt 10380
 40 tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg gtaaattggcc cgcctggctg 10440
 accgccaac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttcca tagtaacgcc 10500
 45 aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaaactg cccacttggc 10560
 agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg acggtaaattg 10620
 50 gccgcctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac tttcctactt ggagtagat 10680
 ctacgtatta gtcacgcta ttacatggt gatgcggtt tggcagtaca tcaatgggag 10740
 55 tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac cccattgacg tcaatgggag 10800
 tttgttttg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact ccgccccatt 10860
 60 gacgcaaattg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat ataagcagag ctcgtttagt 10920
 gaaccgtcag atcgcctgga gacgccatcc acgctgtttt gacctccata gaagacaccg 10980
 65 ggaccgatcc agcctccgcg gccgggaacg gtgcattgga acgcggattc cccgtgcaa 11040
 gagtgacgta agtaccgcct atagagtcta taggcccacc cccttggctt cttatgcatg 11100
 70 ctatactggt tttggcttgg ggtctataca cccccgctt ctcatgttat aggtgatggt 11160
 atagcttagc ctataggtgt gggttattga ccattattga cactcccct attggtgacg 11220
 75 atactttcca ttactaatcc ataacatggc tctttgccac aactctctt attggctata 11280
 tgccaataca ctgtccttca gagactgaca cggactctgt atttttacag gatggggtct 11340
 80 catttattat ttacaaattc acatatacaa caccaccgtc cccagtgcc gcagttttta 11400

ES 2 540 802 T3

ttaaacataa cgtgggatct ccacgcgaat ctcgggtacg tgttccggac atgggctctt 11460
 5 ctccggtagc ggcggagctt ctacatccga gccctgctcc catgcctcca gcgactcatg 11520
 gtcgctcggc agctccttgc tcctaacagt ggaggccaga cttaggcaca gcacgatgcc 11580
 caccaccacc agtgtgccgc acaaggccgt ggcggtaggg tatgtgtctg aaaatgagct 11640
 10 cggggagcgg gcttgcaccg ctgacgcatt tggaagactt aaggcagcgg cagaagaaga 11700
 tgcaggcagc tgagttggtg tgttctgata agagtcagag gtaactcccg ttgcggtgct 11760
 gttaacggtg gagggcagtg tagtctgagc agtactcgtt gctgccgcgc gcgccaccag 11820
 15 acataatagc tgacagacta acagactggt cctttccatg ggtcttttct gcagtcaccg 11880
 tccttgacac g 11891

20 <210> 42
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> sintética

30 <400> 42

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

<210> 43
 <211> 330

ES 2 540 802 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> sintética

<400> 43

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

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

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

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

30 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

35 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

40 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

45 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

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

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

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

65 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

70 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

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

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

ES 2 540 802 T3

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

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

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

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

20 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

25 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

30 <210> 44
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 Ser Asp Phe Ala Trp Asn
1 5

40 <210> 45
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> sintética
<400> 45

50 Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Gln Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

55 <210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> sintética
<400> 46

65 Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr
1 5

<210> 47
<211> 127

ES 2 540 802 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> sintética

 <400> 47

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

 Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val
 15 20 25 30

 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile
 20 35 40 45

 Asn Ser Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys
 25 50 55 60

 Gly Leu Ile Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg
 30 65 70 75 80

 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 35 85 90 95

 Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln
 40 100 105 110

 Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 45 115 120 125

 50
 <210> 48
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> sintética

 <400> 48

 50 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 1 5 10 15

 55 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 20 25 30

 60 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 35 40 45

 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 65 50 55 60

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

ES 2 540 802 T3

	<220>		
	<223>	oligonucleótido sintético	
5	<400>	53	
		cccttcctcc tcaactgggat ttggcagccc cttacctgtg gcggctgcta ccagaaagag	60
		aatgcgccag gtccaatcc	79
10	<210>	54	
	<211>	79	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
15	<220>		
	<223>	oligonucleótido sintético	
	<400>	54	
20		cccagtgagg aggaagggat cgaaggcac catcgaagcc agtcaagggg gcttccatcc	60
		actcctgtgt cttctctac	79
25	<210>	55	
	<211>	80	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
30	<220>		
	<223>	oligonucleótido sintético	
	<400>	55	
35		gactcggctt gacaagccca ggtccactct cttggagctg cacctggctg tggacacctg	60
		tagagaagac acaggagtgg	80
40	<210>	56	
	<211>	84	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
45	<220>		
	<223>	oligonucleótido sintético	
	<400>	56	
		gggcttgca agccgagtca aactttgtcc ctaacatgta ctgtgtccgg atactctatc	60
50		tcatcagatt ttgcgtggaa ttgg	84
55	<210>	57	
	<211>	80	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
60	<220>		
	<223>	oligonucleótido sintético	
	<400>	57	
		cccagagtat gatatgtagc ccatccattc taaacctttc cctggtggct gccttatcca	60
65		attccacgca aatctgatg	80
	<210>	58	
	<211>	79	

	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> oligonucleótido sintético		
	<400> 58		
	gggctacata tcatactctg ggaacaccag atatcaacc tctctgaaaa gccggatcac	60	
10	aatcactagg gacacgtcg		79
	<210> 59		
	<211> 83		
15	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> oligonucleótido sintético		
20	<400> 59		
	gcagtaatat gttgctgtgt ctggggctgt aacggagttc agctgcagga agaactggct	60	
25	cttcgacgtg tccctagtga ttg		83
	<210> 60		
	<211> 81		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> oligonucleótido sintético		
35	<400> 60		
	ccagacacag caacatatta ctgcgtaacc gctggcagag gcttccccta ttggggacag	60	
	ggcaccctag tgacagtgag c		81
40	<210> 61		
	<211> 39		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> oligonucleótido sintético		
	<400> 61		
50	cacggatcca tcttaccgct gctcactgtc actagggtg		39
	<210> 62		
	<211> 26		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> oligonucleótido sintético		
60	<400> 62		
	gagaagcttg ccgccacat ggattg		26
65	<210> 63		
	<211> 80		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		

ES 2 540 802 T3

	<220>		
	<223>	oligonucleótido sintético	
5	<400>	63	
		ctgggatttg gcagcccctt acctggtgcg gctgctacaa gaaacagtat tctccaagtc	60
		caatccatgg tggcggcaag	80
10	<210>	64	
	<211>	78	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
15	<220>		
	<223>	oligonucleótido sintético	
20	<400>	64	
		ggggctgcca aatcccagtg aggaggaagg gatcgaagg gaccatcgaa gccagtcaag	60
		ggggcttcca tccactcc	78
25	<210>	65	
	<211>	77	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
30	<220>		
	<223>	oligonucleótido sintético	
35	<400>	65	
		catgctggat ggactctgag tcactctgaat atcactgtga acacctgtag agaagacaca	60
		ggagtggatg gaagccc	77
40	<210>	66	
	<211>	80	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
45	<220>		
	<223>	oligonucleótido sintético	
50	<400>	66	
		ctcagagtcc atccagcatg tcagtctccg tgggagatag ggtgacgata acctgtcatt	60
		caagccaaga catcaactcc	80
55	<210>	67	
	<211>	82	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
60	<220>		
	<223>	oligonucleótido sintético	
65	<400>	67	
		gttccgtgat agattagtcc tttgaaggac ttaccaggct tctggtggag ccatccaata	60
		ttggagtga tgtcttggct tg	82
	<210>	68	
	<211>	84	

ES 2 540 802 T3

	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220> <223> oligonucleótido sintético		
	<400> 68	caaaggacta atctatcacg gaacaaactt ggacgacggc gtgccatcga gattttcagg	60
10		gtctggcagc gggaccgact atac	84
	<210> 69		
	<211> 76		
15	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220> <223> oligonucleótido sintético		
20	<400> 69	gtgctggacg cagtagtatg tggcaaagtc ttctggctct aagctagaga tggtcagtgt	60
		atagtcggtc ccgctg	76
25			
	<210> 70		
	<211> 79		
	<212> ADN		
30	<213> Secuencia artificial		
	<220> <223> oligonucleótido sintético		
35	<400> 70	catactactg cgtccagcac gctcagttcc cctggacatt cggcggcggc acaaaactgg	60
		aaatcaaacg tgagtaggg	79
40			
	<210> 71		
	<211> 28		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220> <223> oligonucleótido sintético		
	<400> 71	ctcggatccc tactcacggtt tgatttcc	28
50			
	<210> 72		
	<211> 37		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220> <223> oligonucleótido sintético		
60	<400> 72	gacggatcct tctaaactct gagggggtcg gatgacg	37
65	<210> 73		
	<211> 78		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		

ES 2 540 802 T3

	<220>			
	<223>	oligonucleótido sintético		
5	<400>	73	ggagctgcga cggttcctga ggaaagaagc aacaggatg gtgtttaagt aacaatggcc	60
			acgtcatccg accccctc	78
10	<210>	74		
	<211>	78		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
15	<220>			
	<223>	oligonucleótido sintético		
20	<400>	74	ggaaccgtcg cagctccctc cgtgttcatc ttcccccat ccgacgagca actgaagtca	60
			ggcacagcct ccgtggtg	78
25	<210>	75		
	<211>	78		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
30	<220>			
	<223>	oligonucleótido sintético		
35	<400>	75	gtgcgttgtc cactttccac tggactttgg cctctcttgg gtaaaagtta ttaaggaggc	60
			acaccacgga ggctgtgc	78
40	<210>	76		
	<211>	83		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
45	<220>			
	<223>	oligonucleótido sintético		
50	<400>	76	gtggaaagtg gacaacgcac tacagagcgg gaactctcag gaaagcgtga cagagcagga	60
			ctcaaaagat tcaacataca gcc	83
55	<210>	77		
	<211>	88		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
60	<220>			
	<223>	oligonucleótido sintético		
65	<400>	77	cttcacaggc atataccttg tgcttttcat aatcagcttt tgacagtgtc agggtagaag	60
			ataggctgta tgttgaatct tttgagtc	88
	<210>	78		
	<211>	71		

ES 2 540 802 T3

	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
5	<223> oligonucleótido sintético		
	<400> 78		
	gcacaaggta tatgcctgtg aagtaactca tcagggactc agcagccctg tcactaaaag		60
10	ttttaataga g		71
	<210> 79		
	<211> 51		
15	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
20	<223> oligonucleótido sintético		
	<400> 79		
	cctgcgggccg cttatcagca ttcgcctcta ttaaaacttt tggtagagagg g		51
25	<210> 80		
	<211> 1128		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> sintética		
	<400> 80		
35	aagatggcac accgtggccg gcctctgcmc ctgggcccag ctctgtccca caccgcggtc		60
	acatggcacc ttttctcttc cagcctccac caagggcccc agcgtgttcc ccctggcccc		120
	cagcagcaag agcaccagcg gcggcacagc cgccctgggc tgcttggtga aggactactt		180
40	ccccgagccc gtgaccgtga gctggaacag cggagccctg acctccggcg tgcacacctt		240
	ccccgccgtg ctgcagagca gcggcctgta cagcctgagc agcgttggtga ccgtgcccag		300
	cagcagcctg ggcacccaga cctacatctg caacgtgaac cacaagcca gcaacaccaa		360
45	ggtggacaag aaggtggagc ccaagagctg cgacaagacc cacacctgcc ccccctgccc		420
	agccccagag ctgctgggag gaccctccgt gttcctgttc ccccccaagc ccaaggacac		480
50	cctgatgatc agcaggaccc ccgaggtgac ctgctgtggtg gtggacgtga gccacgagga		540
	cccagaggtg aagttcaatt ggtatgtgga cggcgtggag gtgcacaacg ccaagaccaa		600
	gcccagagaa gagcagtaca acagcaccta cagggtggtg tccgtgctga ccgtgctgca		660
55	ccaggactgg ctgaacggca aggaatacaa atgcaaggct tccaacaagg ccctgccagc		720
	ccccatcgaa aagaccatca gcaaggccaa gggccagcca cgggagcccc aggtgtacac		780
60	cctgcccccc tcccgggacg agtgcaccaa gaaccaggtg tccctgacct gtctggtgaa		840
	gggcttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aacggccagc ccgagaacaa		900
	ctacaagacc acccccccag tgctggacag cgacggcagc ttcttcctgt acagcaagct		960
65	gaccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg caacgtgttc agctgcagcg tgatgcacga		1020
	ggccctgcac aaccactaca cccagaagag cctgagcctg tccccggca agttagtgcg		1080

acgcggccgt gcggacgacc gaattcattg atcataatca gccatacc

1128

5 <210> 81
 <211> 465
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintética
 <400> 81

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

20 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30

25 Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile
 35 40 45

30 Ser Ser Asp Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly
 50 55 60

35 Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Gln
 65 70 75 80

40 Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn
 85 90 95

45 Gln Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr
 100 105 110

50 Tyr Tyr Cys Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125

55 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 130 135 140

60 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 145 150 155 160

65 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 165 170 175

70 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 180 185 190

75 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 195 200 205

80 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 210 215 220

ES 2 540 802 T3

5 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 225 230 235 240

10 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 245 250 255

15 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 260 265 270

20 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 275 280 285

25 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 290 295 300

30 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 305 310 315 320

35 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 325 330 335

40 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 340 345 350

45 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 355 360 365

50 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Cys Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 370 375 380

55 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 385 390 395 400

60 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 405 410 415

65 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 420 425 430

70 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 435 440 445

75 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 450 455 460

80 Lys
 465

<210> 82
 <211> 209

ES 2 540 802 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> sintética

 <400> 82

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

 Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val
 15 20 25 30

 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile
 20 35 40 45

 Asn Ser Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys
 25 50 55 60

 Gly Leu Ile Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg
 30 65 70 75 80

 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 35 85 90 95

 Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln His Ala Gln
 40 100 105 110

 Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 45 115 120 125

 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 50 130 135 140

 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 55 145 150 155 160

 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 60 165 170 175

 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 65 180 185 190

 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 70 195 200 205

 60 Lys

 65 <210> 83
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 540 802 T3

<220>
<223> sintética

5 <400> 83

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

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val
20 25 30

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile
35 40 45

Asn Ser Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys
50 55 60

Gly Leu Ile Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg
65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser
85 90 95

Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln
100 105 110

Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

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

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 84
<211> 7

<212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 84
 5 Cys Val Gln His Ala Gln Phe
 1 5

 10 <210> 85
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 15 <400> 85
 Cys Val Gln Tyr Ala Gln Phe
 1 5

 20 <210> 86
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> cebador sintético

 <400> 86
 30 ccacatacta ctgcggtccag tacgctcagt tcccctggac 40

 <210> 87
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador sintético
 40 <400> 87
 ctggacgcag tagtatgtgg 20

 45 <210> 88
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> cebador sintético

 <400> 88
 55 gagaagcttg ccgccacat ggattg 26

 <210> 89
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador sintético
 65 <400> 89
 cactgggtga ctggcttcga tggtgacc 28

<210> 90
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 90
 10 ggtcaccatc gaagccagtc acccagtga gggggcttcc atccactcc 49
 <210> 91
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> cebador sintético
 20
 <400> 91
 ccaagatctg gccggccacg gtgtgccatc ttaccgctgc tcac 44
 <210> 92
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> cebador sintético
 30
 <400> 92
 35 gagaagcttg ccgccacat gg 22
 <210> 93
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> cebador sintético
 45
 <400> 93
 cgggtccgccc ccttgactgg cttcg 25
 <210> 94
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> cebador sintético
 55
 <400> 94
 cgaagccagt caagggggcg gaccgcttcc atccactcct gtgtc 45
 60
 <210> 95
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65
 <220>
 <223> cebador sintético

<400> 95
 ccaagatctt taattaacgg accgctactc acgtttgatt tccagttttg 50

5 <210> 96
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <400> 96
 Ser Val Thr Ile Glu Asp Thr
 1 5

15 <210> 97
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> sintética

25 <400> 97
 Ser Val Thr Ala Pro Asp Thr
 1 5

30 <210> 98
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> sintética

40 <400> 98
 Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr
 1 5

45 <210> 99
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> cebador sintético

<400> 99
 ctgcagctga actccgttac agccgcagac acagcaacat attactgcg 49

55 <210> 100
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> cebador sintético

65 <400> 100
 cgcagtaata tgttgctgtg tctgcggctg taacggagtt cagctgcag 49

<210> 101

ES 2 540 802 T3

<211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> sintética
 <400> 101
 10 Thr Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Phe Phe Leu Gln
 1 5 10
 <210> 102
 15 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> sintética
 <400> 102
 Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Lys
 25 1 5 10
 <210> 103
 30 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> cebador sintético
 <400> 103
 ggtcaccatc gaagccagtc acccagtgaa gggggcttcc atccactcc 49
 40 <210> 104
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 104
 gattcttcga cgtgtccctt gagattgtga tccggctttt cagag 45
 50
 <210> 105
 55 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador sintético
 60 <400> 105
 caagggacac gtcgaagaat cagttcttcc tgaaactgaa ctccgttaca gccgc 55
 65 <210> 106
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador sintético

 <400> 106
 5 ccaagatctg gccggccacg gtgtgccatc ttaccgctgc tcac 44

 <210> 107
 <211> 6
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sintética
 15
 <400> 107

 Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 1 5
 20

 <210> 108
 <211> 6
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> sintética
 30
 <400> 108

 Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 1 5
 35

 <210> 109
 <211> 45
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador sintético

 <400> 109
 45 cgaagccagt caagggggcg gaccgcttcc atccactcct gtgtc 45

 <210> 110
 <211> 34
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cebador sintético
 55
 <400> 110
 ctctggttgt aagctagaga tggtcagtgt atag 34

 <210> 111
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60

 <220>
 <223> cebador sintético
 65
 <400> 111

	ccatctctag cttacaacca gaggactttg ccacatacta ctgcg	45
5	<210> 112 <211> 50 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador sintético	
	<400> 112 ccaagatctt taattaacgg accgctactc acgtttgatt tccagttttg	50
15	<210> 113 <211> 8 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> sintética	
25	<400> 113 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His 1 5	
30	<210> 114 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador sintético	
40	<400> 114 ggcggcacia aactggaaat c	21
45	<210> 115 <211> 59 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador sintético	
50	<400> 115 gatgagttac ttcacaggca tatactttgt gcttttcata atcagctttt gacagtgtc	59
55	<210> 116 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> cebador sintético	
	<400> 116 agtatatgcc tgtgaagtaa ctcac	26
65	<210> 117 <211> 17 <212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> cebador sintético	
	<400> 117	
	gccacgatgc gtccggc	17
10	<210> 118	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador sintético	
	<400> 118	
20	gcacttgatg taattctcct tgg	23
	<210> 119	
	<211> 19	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador sintético	
30	<400> 119	
	gaagtagtcc ttgaccagg	19
	<210> 120	
35	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> cebador sintético	
	<400> 120	
	gaagatgaag acagatggtg cag	23
45	<210> 121	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> cebador sintético	
	<400> 121	
55	cggtggaggg cagtgtagtc	20
	<210> 122	
	<211> 21	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador sintético	
65	<400> 122	
	gtgatgctat tgctttattt g	21

5	<p><210> 123 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p> <p><220> <223> cebador sintético</p>	
10	<p><400> 123 catacctacc agttctgcdc c</p>	21
15	<p><210> 124 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p> <p><220> <223> cebador sintético</p>	
20	<p><400> 124 ccatcctggt tgcttctttc c</p>	21
25	<p><210> 125 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p> <p><220> <223> cebador sintético</p>	
30	<p><400> 125 gacagggctg ctgagtc</p>	17
35	<p><210> 126 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p> <p><220> <223> cebador sintético</p>	
40	<p><400> 126 gtgcagctcc aagagagtgg ac</p>	22
45	<p><210> 127 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p> <p><220> <223> cebador sintético</p>	
50	<p><400> 127 cagagtccat ccagcatgtc</p>	20
55	<p><210> 128 <211> 363 <212> ADN <213> Mus musculus</p> <p><400> 128 ttagtcaagc tgcaggagtc tggacctagc ctggtgaaac cttctcagtc tctgtccctc</p>	60

ES 2 540 802 T3

acctgcactg tcaactggcta ctcaatcacc agtgactatg cctggaactg gatccggcag 120
 5 tttccaggaa acaaactgga gtggatgggc tacataagtt acagtgctaa cactaggtac 180
 aacctatctc tcaaaagtcg aatctctatc actcgagaca catccaagaa ccaattcttc 240
 ctgcagttga attctgtgac tactgaggac acagccacat attactgtgc aacggcggga 300
 10 cgcgggtttc cttactgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgcagc caaaacgaca 360
 ccc 363

15 <210> 129
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <400> 129

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

55 <210> 130
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

60 <400> 130

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
 1 5

65 <210> 131
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

ES 2 540 802 T3

<400> 131

5 Tyr Ile Ser Tyr Ser Ala Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 132

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 132

15 Ala Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr
1 5

<210> 133

20 <211> 324

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 133

25 gacattgtgc tgaccagtc tccatcctcc atgtctctat ctctgggaga cacagtcagt 60
atcacttgcc attcaagtca ggacattaac agtaatatag ggtggttgca gcagaaacca 120
30 gggaaatcat ttaagggcct gatctatcat ggaaccaact tggacgatgg agttccatca 180
aggttcagtg gcagtgatc tggagccgat tattctctca ccatcagcag cctggaatct 240
gaagattttg tagactatta ctgtgtacag tatggtcagt ttccgtggac gttcgggtgga 300
35 ggcaccaagc tggaaatcaa acgg 324

<210> 134

<211> 107

40 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 134

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

50 Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Ser Asn Ile
20 25 30

55 Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile Tyr
35 40 45

His Gly Thr Asn Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

60 Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu
65 70 75 80

65 Asp Phe Val Asp Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Gly Gln Phe Pro Trp Thr
85 90 95

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

5 <210> 135
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <400> 135
 His Ser Ser Gln Asp Ile Ser Ser Asn Ile Gly
 1 5 10

15 <210> 136
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <400> 136
 His Gly Thr Asn Leu Glu Asp
 1 5

25 <210> 137
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

30 <400> 137
 Cys Val Gln Tyr Gly Gln Phe Pro Trp Thr
 1 5 10

35 <210> 138
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> sintética
 45 <400> 138

50 Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu Asp Gly Val Arg Lys Cys
 1 5 10 15

55 <210> 139
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

60 <400> 139
 His Gly Thr Asn Leu Asp Asp
 1 5

65 <210> 140
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 140

His Gly Thr Asn Leu Asp Asp
 1 5
 5
 <210> 141
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 10
 <400> 141
 His Gly Thr Asn Leu Glu Asp
 1 5
 15
 <210> 142
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 20
 <400> 142
 His Gly Thr Asn Leu Asp Asp
 1 5
 25
 <210> 143
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 30
 <400> 143
 Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Phe Ala Trp Asn
 1 5 10
 35
 <210> 144
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 40
 <400> 144
 45
 Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 1 5 10 15
 50 Ser
 55
 <210> 145
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 60
 <400> 145
 Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
 1 5 10
 65
 <210> 146
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 540 802 T3

<220>
 <223> sintética

5 <400> 146

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

10 Ser

15 <210> 147
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <400> 147

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
 1 5 10

25 <210> 148
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

30 <400> 148

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

35 Ser

40 <210> 149
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

45 <400> 149

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
 1 5 10

50 <210> 150
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

55 <400> 150

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

60 Ser

65 <210> 151
 <211> 11

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> sintética
 <220>
 10 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es un aminoácido que tiene un grupo R polar no cargado
 <400> 151
 15 His Ser Ser Gln Asp Ile Xaa Ser Asn Ile Gly
 1 5 10
 <210> 152
 20 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> sintética
 <220>
 30 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es un residuo de aminoácido que tiene un grupo R polar cargado
 <400> 152
 35 His Gly Thr Asn Leu Xaa Asp
 1 5
 <210> 153
 40 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> sintética
 <220>
 50 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa se selecciona del grupo que consiste en Ala, Gly, y un residuo de
 aminoácido que está sustituido de forma conservativa por Ala o Gly
 <400> 153
 55 Val Gln Tyr Xaa Gln Phe Pro Trp Thr
 1 5
 60 <210> 154
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> sintética

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 5 <223> Xaa se selecciona del grupo que consiste en Phe, Tyr, y un residuo de aminoácido que está sustituido de forma conservativa por Phe o Tyr
 <400> 154
 Ser Asp Xaa Ala Trp Asn
 10 1 5
 <210> 155
 <211> 16
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintética
 20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 25 <223> Xaa es un aminoácido que tiene un grupo R polar no cargado
 <400> 155
 Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Xaa Pro Ser Leu Lys Ser
 30 1 5 10 15
 <210> 156
 <211> 16
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> sintética
 40
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 45 <223> Xaa se selecciona del grupo que consiste en Gly, Ala, y un residuo de aminoácido que está sustituido de forma conservativa por Gly o Ala
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 50 <223> Xaa se selecciona del grupo que consiste en Gly, Ala, y un residuo de aminoácido que está sustituido de forma conservativa por Gly o Ala
 <400> 156
 55 Tyr Ile Ser Tyr Ser Xaa Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 60 <210> 157
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> sintética

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa es un residuo de aminoácido básico
 5
 <400> 157
 Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu Xaa Ser
 1 5 10 15
 10
 <210> 158
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> sintética
 20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa se selecciona del grupo que consiste en Val, Ala, y un residuo de
 25 aminoácido que está sustituido de forma conservativa por Val o Ala
 <400> 158
 Xaa Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr
 1 5
 30
 <210> 159
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> sintética
 40
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa es un aminoácido que tiene un grupo R polar no cargado
 45
 <400> 159
 Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Xaa Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 50
 <210> 160
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> vector sintético
 60
 <400> 160
 Met Val Ser Thr Ala Gln Phe Leu Ala Phe Leu Leu Leu Trp Phe Pro
 1 5 10 15
 65
 Gly Ala Arg Cys Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser
 20 25 30

ES 2 540 802 T3

5 Val Ser Leu Gly Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp
35 40 45

10 Ile Asn Ser Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ser Phe
50 55 60

15 Lys Gly Leu Ile Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Glu Val Pro Ser
65 70 75 80

20 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
85 90 95

25 Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln His Ala
100 105 110

30 Gln Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

<210> 161
<211> 134
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> vector sintético

35 <400> 161

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

45 Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro
20 25 30

50 Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
35 40 45

55 Ser Asp Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu
50 55 60

60 Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Asn Thr Arg Tyr Asn Pro
65 70 75 80

65 Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95

70 Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ile Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
100 105 110

75 Tyr Cys Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

ES 2 540 802 T3

Leu Val Thr Val Ser Ala
130

5 <210> 162
 <211> 11891
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> plasmid

<400> 162

15 ttcgaacggc ggtggtacct aacctggacc gcgtaagaga aagaccatcg tcggcgggtg 60

ccattccccg acggtttagg gtcactcctc cttccctagc ttccagtggg agcttcggtc 120

agtgggtcac ttccccgaa ggtaggtgag gacacagaag agatgtccac aggtgtcggg 180

20 ccacgtcgag gttctctcac ctggaccca acagttcggc tcagtttgaa acagggattg 240

tacatgacac aggcctatga gatagagtag tctaaaacgc acctaacct attccgtcgg 300

25 tgggtcccttt ccaaacttta cctacccgat gtatagtatg agacccttgt ggtctatagt 360

tggaagagac ttttcggcct agtgtagag ttccctgtgc agcttcttag tcaagaagga 420

ctttgacttg aggcaatgtc ggcgtctgtg tcgttgtata atgacgcatt ggcgaccgtc 480

30 tccgaagggg ataaccctg tcccgtggga tcaactgtcac tcgtcgccat tctaccgtgt 540

ggcaccggcc ggagacgcgg acccgggctg agacaggggtg tggcgccagt gtaccgtgga 600

35 aaagagaagg tcggaggtgg ttcccggggc cgcacaaggg ggaccggggg tcgtcgttct 660

cgtgggtcgcc gccgtgtcgg cgggaccca cggaccactt cctgatgaag gggctcgggc 720

actggcactc gaccttgtcg cctcgggact ggaggccgca cgtgtggaag gggcggcagc 780

40 acgtctcgtc gccggacatg tcggactcgt cgcaccactg gcacgggtcg tcgtcggacc 840

cgtgggtctg gatgtagacg ttgcacttgg tgttcgggtc gttgtggttc cacctgttct 900

45 tccacctcgg gttctcgacg ctgttctggg tgtggacggg ggggacgggt cggggctctc 960

acgaccgcc tgggaggcac aaggacaagg gggggttcgg gttcctgtgg gactactagt 1020

cgctctgggg gctccactgg acgcaccacc acctgcactc ggtgctcctg ggtctccact 1080

50 tcaagttaac catacactg ccgcacctcc acgtgttgcg gttctgggtc gggctctctc 1140

tcgtcatggt gtcgtggatg tcccaccaca ggcacgactg gcacgacgtg gtcctgaccg 1200

acttgccggt ctttatgttt acgttccaga ggttgttccg ggacgggtcg gggtagcttt 1260

55 tctggtagtc gttccggttc ccggtcgggt ccctcggggg ccacatgtgg gacgggggga 1320

gggccctgct cacgtggttc ttggtccaca gggactggac agaccacttc ccgaagatgg 1380

60 ggtcgtgta gcggcacctc accctctcgt tgccgggtcg gctcttgttg atgttctggt 1440

gggggggtca cgacctgctg ctgccgtcga agaaggacat gtcgttcgac tggcacctgt 1500

65 tctcgtccac cgtcgtcccg ttgcacaagt cgacgtcgca ctacgtgctc cgggacgtgt 1560

tgggtgatgtg ggtcttctcg gactcggaca gggggccgtt cactactgct gcgccggcac 1620

gcctgctggc ttaagtaact agtattagtc ggtatggtgt aaacatctcc aaaatgaac 1680

ES 2 540 802 T3

	aaatTTTTTg	gagggTgtgg	agggggactt	ggactTTtgta	TTTTacttac	gTtaacaaca	1740
5	acaattgaac	aaataacgTc	gaatattacc	aatgTTtatt	tcgTtatcgt	agtgtTTtaa	1800
	gtgTTtattt	cgtaaaaaaa	gtgacgtaag	atcaacacca	aacaggTTtg	agtagttaca	1860
	tagaatagta	cagaccgccg	gCGgctataa	actTTtatac	cgTataactt	ttacagcggc	1920
10	tacactcaaa	gacacattga	ctatagcggT	aaaaaggTTt	tcactaaaaa	cccgtatgCg	1980
	ctatagaccg	ctatcgcgaa	tatagcaaat	gccccctacc	gctatctgct	gaaaccactg	2040
	aaccCGctaa	gacacacagc	gTTtatagcG	tcaaagctat	atccactgTc	Tgctatactc	2100
15	cgatataGcg	gctatctccg	ctgtagttcG	accgTgtacc	ggttacgTat	agctagatat	2160
	gTaaCTtagt	tataaccggT	aatcggTata	ataagtaacc	aatatatcgt	atttagttat	2220
20	aaccgataac	cggtaacgta	Tgcaacatag	gtatagTatt	atacatgTaa	atataaccga	2280
	gtacaggTTg	taatggcggT	acaactgTaa	ctaataactg	atcaataatt	atcattagtt	2340
	aatgccccag	taatcaagta	tCGggtatat	acctcaaggc	gcaatgtatt	gaatgccatt	2400
25	taccgggCcg	accgactggc	gggTtgctgg	gggCGggTaa	ctgcagttat	tactgcatac	2460
	aagggtatca	TtgCGgttat	ccctgaaagg	taactgcagT	taccacctc	ataaatgcca	2520
30	TTtgacgggT	gaaccgTcat	gtagTtcaca	tagtatacgg	TtcatgCggg	ggataactgC	2580
	agTtactgCc	atTtaccggg	cggaccgTaa	tacgggTcat	gtactggaat	accctgaaag	2640
	gatgaaccgT	catgtagatg	cataatcagT	agcgataatg	gtaccactac	gccaaaaccg	2700
35	tcatgtagtt	accCGcacct	atCGccaaac	TgagTgcccc	TaaaggTtca	gaggTggggT	2760
	aactgcagtt	accctcaaac	aaaaccgTgg	TTTTagTtgc	cctgaaaggT	TTTacagcat	2820
40	TgTtgaggcg	gggTaaCTgc	gTTTaccCGc	catccgcaca	TgCCaccctc	cagatatatt	2880
	cgtctcgagc	aaatcactTg	gcagTctagc	ggacctctgC	ggtaggtgCg	acaaaactgg	2940
	aggTatcttc	Tgtggccctg	gctaggTcgg	aggCGccggc	cctTgCCacg	TaacctTgCg	3000
45	cctaaggggc	acggtTctca	ctgcattcat	ggCGgatatc	Tcagatatcc	gggTggggga	3060
	accgaagaat	acgtacgata	Tgacaaaaac	cgaacCCcag	atatgtgggg	gcgaaggagt	3120
50	acaatatcca	ctaccatatc	gaatcggata	Tccacaccca	ataactggta	ataactggTg	3180
	aggggataac	cactgctatg	aaaggTaatg	attaggTatt	gtaccgagaa	acggTgttga	3240
	gagaaataac	cgatatacgg	Ttatgtgaca	ggaagtctct	gactgtgcct	gagacataaa	3300
55	aatgtcctac	cccagagTaa	ataataaatg	TttaagtGta	TatgtTgtgg	TggcaggggT	3360
	cacgggCgTc	aaaaataatt	Tgtattgcac	cctagaggTg	Cgcttagagc	ccatgcacaa	3420
60	ggcctgtacc	cGagaagagg	ccatCGccgc	ctcgaagatg	taggctcggg	acgagggTac	3480
	ggaggTcGct	gagtaccagc	gagccgTcga	ggaacgagga	Ttgtcacctc	Cggtctgaat	3540
	ccgtgtcgtg	ctacgggTgg	TggTggTcac	acggcgtgtt	ccggcaccgc	catcccatac	3600
65	acagactTTt	actCGagccc	ctCGcccGaa	cgtggcgact	gcgTaaacct	Tctgaattcc	3660
	gtcGccgtct	TctTctacgt	ccgtcGactc	aacaacacaa	gactattctc	agtctccatt	3720

ES 2 540 802 T3

	gagggcaacg	ccacgacaat	tgccacctcc	cgtcacatca	gactcgtcat	gagcaacgac	3780
5	ggcgcgcgcg	gtggtctgta	ttatcgactg	tctgattgtc	tgacaaggaa	aggtaccag	3840
	aaaagacgtc	agtggcagga	actgtgcttc	gaacggcggg	ggtacctaac	ctgaacctct	3900
	tatgacaaag	aacatcgtcg	gcgttgcca	ttccccgacg	gtttagggtc	actcctcctt	3960
10	ccctagcttc	cactggtagc	ttcggtcagt	tccccgcct	ggcgaaggta	ggtgaggaca	4020
	cagaagagat	gtccacaagt	gtcactataa	gtctactgag	tctcaggtag	gtcgtacagt	4080
	cagaggcacc	ctctatccca	ctgctattgg	acagtaagtt	cggttctgta	gttgaggtta	4140
15	taacctaccg	aggttgtctt	cggaccattc	aggaagtttc	ctgattagat	agtgccttgt	4200
	ttgaacctgc	tgccgcacgg	tagctctaaa	agtcccagac	cgtcgccctg	gctgatatgt	4260
20	gactggtaga	gatcgaatgt	tggctctctg	aaacgggtgta	tgatgacgca	ggtcatgca	4320
	gtcaagggga	cctgtaagcc	gccgccgtgt	tttgaccttt	agtttgact	catcgccagg	4380
	caattaattt	ctaggaagat	ttgagactcc	cccagcctac	tgaccggta	acaatgaatt	4440
25	tgtggtagga	caaacgaaga	aaggagtcct	tggcagcgtc	gagggaggca	caagtagaag	4500
	gggggtaggc	tgctcgttga	cttcagtccg	tgctcggaggc	accacacgga	ggaattattg	4560
30	aaaatggggt	ctctccgggt	tcaggtcacc	tttcacctgt	tgctgatgt	ctcgcccttg	4620
	agagtccttt	cgcactgtct	cgctctgagt	tttctaagtt	gtatgtcgga	tagaagatgg	4680
	gactgtgaca	gttttcgact	aatacttttc	gtgtttcata	tacggacact	tcattgagta	4740
35	gtccctgagt	cgctcgggaca	gtgattttca	aaattatctc	cgcttacgac	tattcgccgg	4800
	cacgcctgct	ggcttaagta	actagtatta	gtcggtatgg	tgtaaacatc	tccaaaatga	4860
40	acgaaatttt	ttggaggggtg	tggaggggga	cttggacttt	gtattttact	tacgttaaca	4920
	acaacaattg	aacaataaac	gtcgaatatt	accaatgttt	atttcgttat	cgtagtgttt	4980
45	aaagtgttta	tttcgtaaaa	aaagtgacgt	aagatcaaca	ccaacaggt	ttgagtagtt	5040
	acatagaata	gtacagacct	aggagatgcg	gcctgcgtag	caccggccgt	agtggccgcg	5100
	gtgtccacgc	caacgaccgc	ggatatagcg	gctgtagtgg	ctacccttc	tagcccagc	5160
50	ggtgaagccc	gagtactcgc	gaacaaagcc	gcaccatac	caccgtccgg	ggcaccggcc	5220
	ccctgacaac	ccgcggtaga	ggaacgtacg	tggttaaggaa	cgccgccgcc	acgagttgcc	5280
55	ggagttggat	gatgaccgga	cgaaggatta	cgctctcagc	gtattccctc	tcgcagctgg	5340
	agcccggcgc	aacgaccgca	aaaaggatc	cgaggcgggg	ggactgctcg	tagtgttttt	5400
	agctgcgagt	tcagtctcca	ccgctttggg	ctgtcctgat	atctctatgg	tccgcaaagg	5460
60	gggaccttcg	agggagcacg	cgagaggaca	aggctgggac	ggcgaatggc	ctatggacag	5520
	gcggaagag	ggaagccctt	cgcaccgca	aagagtatcg	agtgcgacat	ccatagagtc	5580
	aagccacatc	cagcaagcga	ggttcgacct	gacacacgtg	cttggggggc	aagtcgggct	5640
65	ggcgacgcgg	aataggccat	tgatagcaga	actcaggttg	ggccattctg	tgctgaatag	5700
	cggtgaccgt	cgctcggtag	cattgtccta	atcgtctcgc	tccatacatc	cgccacgatg	5760

ES 2 540 802 T3

	tctcaagaac	ttcaccaccg	gattgatgcc	gatgtgatct	tcttgtcata	aaccatagac	5820
5	gcgagacgac	ttcgggtcaat	ggaagccttt	ttctcaacca	tcgagaacta	ggccgtttgt	5880
	ttggtggcga	ccatcgccac	caaaaaaaca	aacgttcgtc	gtctaatacg	cgtctttttt	5940
	tcctagagtt	cttctaggaa	actagaaaag	atgccccaga	ctgcgagtca	ccttgctttt	6000
10	gagtgcaatt	ccctaaaacc	agtactctaa	tagtttttcc	tagaagtgga	tctaggaaaa	6060
	tttaattttt	acttcaaaat	ttagttagat	ttcatatata	ctcatttgaa	ccagactgtc	6120
	aatggttacg	aattagtcac	tccgtggata	gagtcgctag	acagataaag	caagtaggta	6180
15	tcaacggact	gaggggcagc	acatctattg	atgctatgcc	ctcccgaatg	gtagaccggg	6240
	gtcacgacgt	tactatggcg	ctctgggtgc	gagtggccga	ggtctaaata	gtcgttattt	6300
20	ggtcggtcgg	ccttcccggc	tcgctcttc	accaggacgt	tgaaataggc	ggaggtaggt	6360
	cagataatta	acaacggccc	ttcgatctca	ttcatcaagc	ggtcaattat	caaacgcggt	6420
	gcaacaacgg	taacgatgtc	cgtagcacca	cagtgcgagc	agcaaaccat	accgaagtaa	6480
25	gtcgaggcca	agggttgcta	gttccgctca	atgtactagg	gggtacaaca	cgttttttcg	6540
	ccaatcgagg	aagccaggag	gctagcaaca	gtcttcattc	aaccggcgtc	acaatagtga	6600
30	gtaccaatac	cgtcgtgacg	tattaagaga	atgacagtac	ggtaggcatt	ctacgaaaag	6660
	acactgacca	ctcatgagtt	ggttcagtaa	gactcttatc	acatacgccg	ctggctcaac	6720
	gagaacgggc	cgcagttatg	ccctattatg	gcgcggtgta	tcgtcttgaa	attttcacga	6780
35	gtagtaacct	tttgcaagaa	gccccgcttt	tgagagtcc	tagaatggcg	acaactctag	6840
	gtcaagctac	attgggtgag	cacgtgggtt	gactagaagt	cgtagaaaat	gaaagtggtc	6900
40	gcaaagacc	actcgttttt	gtccttccgt	tttacggcgt	tttttccctt	attcccgtg	6960
	tgcctttaca	acttatgagt	atgagaagga	aaaagttata	ataacttcgt	aaatagtccc	7020
45	aataacagag	tactcgccta	tgtataaact	tacataaatc	tttttatttg	tttatcccca	7080
	aggcgcgtgt	aaaggggctt	ttcacgggtg	actgcagatt	ctttggtaat	aatagtactg	7140
	taattggata	tttttatccg	catagtgtc	cgggactacc	gagaaacgcc	gtgggtagca	7200
50	agcattacaa	ggcaccgtgg	ctcctgttgg	gagttctctt	ttacattagt	gtgaccgagt	7260
	ggaagcccac	ccggaaagac	gcaaataattc	ctctgtgaaa	tacaaattct	tccaaccatt	7320
55	taaggaacgc	cgaaaccgtc	ggttcgatct	aggccgacac	cttacacaca	gtcaatccca	7380
	cacctttcag	gggtccgagg	ggtcgtccgt	cttcatacgt	ttcgtacgta	gagttaatca	7440
	gtcgttggtc	cacacctttc	aggggtccga	ggggtcgtcc	gtcttcatac	gtttcgtacg	7500
60	tagagttaat	cagtcgttgg	tatcagggcg	gggattgagg	cgggtagggc	ggggattgag	7560
	gcgggtaag	gcgggtaaga	ggcgggggtac	cgactgatta	aaaaaaataa	atacgtctcc	7620
	ggctccggcg	gagccggaga	ctcgataaag	tcttcatcac	tcctccgaaa	aaacctccgg	7680
65	atccgaaaac	gtttttcgat	cgaacccccg	tggcaggtct	cgtggaaggt	ggtaccggtg	7740
	gagtcgttca	aggggtgaact	tgtttttgta	gttcgtttac	atgaacacgg	acggggtccc	7800

ES 2 540 802 T3

actctttcag gttcgggtaca tatagacca actaccatga cctcttcctg acgcgacgtt 7860
 5 ttgggcgctgg gacctgacac tcggggtcac acatcttctc aatggactca ccttaaaact 7920
 accgagatca tggaaagtca gactccccgag gttgtcactg tacatagagt cgggacaacg 7980
 gtacaaagcc ctggggaagg cgtctctagg gttgttcgac cacaagacac ttcaaaagtt 8040
 10 catgttggcc ttcggacgct tctggttaaa ttccgtgagc acatttgcct attacctgta 8100
 ccactcgttg gtcgtgggga ccaaacctta ccttgcctc atatgagact acccttgtct 8160
 acccggtgga aaaccaaccg gaaggttacc gaaaggacc ggggttccag gcataatgac 8220
 15 accacacccg cgtctgtttc ggataccgct cctatagcac ctccgagtga tggcgcggac 8280
 gaacatacga cccagttct aatgtccttg tttacgactc cagtacggac gggtcaccct 8340
 20 tgaggtttat cctgggacac ttccttaggc gtaccctcta gtagagacc accgggcaa 8400
 gtagaacgta gtcatacac ttctgaaacc ccattatcgt tggaaactgg ggttcgggta 8460
 aggacccttg accttaccac gtccgacggt atggttgaaa tcgtggttcc ggtacgcct 8520
 25 cctcttacca gacttcgtgt agctcctccg gtagctcttt gattcgttcg ccgtggccat 8580
 ggtgtaagct cggatgctag gggtccccc ggacctgta cgggcaccag actgaccaa 8640
 30 ggtgctttgc aggttgtagt tgctgaaaag acgaccacag cggtagcgt cacggtcgta 8700
 ggcgtaaggg gcctgacagc cggctccttt cttccaatg aaacttctgg cgccggggag 8760
 acggttaaca ctggggaaac gtcactgtct tcggtagcag gctgtacgg aagagttact 8820
 35 ctgaccgctg ctcgggaagg ttatgttttt gattaatctg aaactcacta gaactcggaa 8880
 aggatcaagt aggggtggggc ggggtctctc tagaaacact tccttggaaat gaagacacca 8940
 40 cactgtatta acctgtttga tggatgtctc taaatttcga gattccattt atattttaa 9000
 aattcacata ttacacaatt tgatgactaa gattaacaaa cacataaaat ctaaggttgg 9060
 45 atacctgac tacttacct cgtcaccacc ttacggaaat tactcctttt ggacaaaacg 9120
 agtcttcttt acggtagatc actactactc cgatgacgac tgagagttgt aagatgagga 9180
 ggttttttct tctctttcca tcttctgggg ttcctgaaag gaagtcttaa cgattcaaaa 9240
 50 aactcagtac gacacaaatc attatcttga gaacgaacga aacgataaat gtgggtgtttc 9300
 ctttttcgac gtgacgatat gttcttttaa taccttttta taagacattg gaaatattca 9360
 tccgtattgt caatattagt attgtatgac aaaaaagaat gaggtgtgtc cgtatctcac 9420
 55 agacgataat tattgatacg agtttttaac acatggaaat cgaaaaatta aacatttccc 9480
 caattattcc ttataaacta catatcacgg aactgatctc tagtattagt cggtatgggtg 9540
 60 taaacatctc caaaatgaac gaaatttttt ggaggggtgtg gagggggact tggactttgt 9600
 attttactta cgttaacaac aacaattgaa caaataacgt cgaatattac caatgtttat 9660
 65 ttcgttatcg tagtgtttaa agtgtttatt tcgtaaaaaa agtgacgtaa gatcaacacc 9720
 aaacaggttt gagtagttac atagaatagt acagacctag atcgaagcac agttcctgcc 9780
 actgacgtca cttattattt tacacacaaa caggctttat gcgcaaaact ctaaagacag 9840

ES 2 540 802 T3

cggctgattt aagtacagcg cgctatcacc acaaatagcg gctatctcta ccgctataac 9900
 5 ctttttagct ataaactttt ataccgtata acttttacag cggctacact caaagacaca 9960
 ttgactatag cggtaaaaag gttttcacta aaaaccgta tgcgctatag accgctatcg 10020
 cgaatatagc aaatgcccc taccgctatc tgctgaaacc actgaaccg ctaagacaca 10080
 10 cagcgtttat agcgtcaaag ctatatccac tgtctgctat actccgatat agcggctatc 10140
 tccgctgtag ttcgaccgtg taccggttac gtatagctag atatgtaact tagttataac 10200
 cggtaatcgg tataataagt aaccaatata tcgtatttag ttataaccga taaccggtaa 10260
 15 cgtatgcaac ataggtatag tattatacat gtaaataataa ccgagtacag gttgtaatgg 10320
 cggtaacaact gtaactaata actgatcaat aattatcatt agttaatgcc ccagtaatca 10380
 20 agtatcgggt atatacctca aggcgcaatg tattgaaatgc catttaccgg gcggaccgac 10440
 tggcggggtg ctgggggcg gtaactgcag ttattactgc atacaagggt atcattgcgg 10500
 ttatccctga aaggtaactg cagttacca cctcataaat gccatttgac ggggtaaccg 10560
 25 tcatgtagtt cacatagtat acggttcatg cgggggataa ctgcagttac tgccatttac 10620
 cgggcggacc gtaatacggg tcatgtactg gaataccctg aaaggatgaa ccgtcatgta 10680
 30 gatgcataat cagtagcgat aatggtacca ctacgcaaaa accgtcatgt agttaccgcg 10740
 acctatcgcc aaactgagtg cccctaaagg ttcagagggtg gggtaactgc agttaccctc 10800
 aaacaaaacc gtggtttttag ttgccctgaa aggttttaca gcattgttga ggcggggtaa 10860
 35 ctgcgtttac ccgccatccg cacatgccac cctccagata tattcgtctc gagcaaatca 10920
 cttggcagtc tagcggacct ctgcggtagg tgcgacaaaa ctggaggat cttctgtggc 10980
 40 cctggctagg tcggaggcgc cggcccttgc cacgtaacct tgcgcctaag gggcacgggt 11040
 ctactgcat tcatggcgga tatctcagat atccgggtgg ggaaccgaa gaatacgtac 11100
 gatatgacaa aaaccgaacc ccagatatgt gggggcgaag gagtacaata tccactacca 11160
 45 tatcgaatcg gatatccaca ccaataact ggtaataact ggtgagggga taaccactgc 11220
 tatgaaaggt aatgattagg tattgtaccg agaaacggtg ttgagagaaa taaccgatat 11280
 50 acggttatgt gacaggaagt ctctgactgt gcctgagaca taaaaatgtc ctacccaga 11340
 gtaaataata aatgtttaag tgtatatggt gtggtggcag gggtcacggg cgtcaaaaat 11400
 aatttgtatt gcaccctaga ggtgcgctta gagcccatgc acaaggcctg tacccgagaa 11460
 55 gaggccatcg ccgcctcgaa gatgtaggct cgggacgagg gtacggagggt cgctgagtac 11520
 cagcgagccg tcgaggaacg aggattgtca cctccggtct gaatccgtgt cgtgctacgg 11580
 60 gtggtggtgg tcacacggcg tgttccggca ccgccatccc atacacagac ttttactcga 11640
 gccctcgcc cgaacgtggc gactgcgtaa accttctgaa ttccgtcgcc gtcttcttct 11700
 acgtccgctg actcaacaac acaagactat tctcagtctc cattgagggc aacgccacga 11760
 65 caattgccac ctcccgtcac atcagactcg tcatgagcaa cgacggcgcg cgcggtggtc 11820
 tgtattatcg actgtctgat tgtctgacaa ggaaaggtag ccagaaaaga cgtcagtggc 11880

aggaactgtg c

11891

5 <210> 163
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sintética
 <400> 163

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

20 Val His Ser

25 <210> 164
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> sintética
 <400> 164

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

40 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Asp
 20 25 30

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

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

55 Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80

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

65 Val Thr Ala Gly Arg Gly Phe Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

60 Thr Val Ser Ser
 115

65 <210> 165
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 540 802 T3

<220>
 <223> sintética

5 <400> 165

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

10 Val His Ser

15 <210> 166
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> sintética

<400> 166

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

30 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn
 20 25 30

Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile
 35 35 40 45

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

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

45 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp
 85 90 95

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

55 <210> 167
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 167

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

65 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 5 <400> 169
 acctaacctg gaccgcgtaa gagaaagacc atcgtcggcg gtgtccattc cccgacggtt 60
 tagggtcact cctccttccc 80
 10
 <210> 170
 <211> 81
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 20 <400> 170
 atcccagtga ggaggaaggg atcgaaggtc accatcgaag ccagtcaagg gggcttccat 60
 ccactcctgt gtcttctcta c 81
 25
 <210> 171
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 171
 35 ggtgaggaca cagaagagat gtccacagg tgcggtcac gtcgaggttc tctcacctgg 60
 acccgaacag ttcggctcag 80
 40 <210> 172
 <211> 85
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 172
 50 tgggcttgtc aagccgagtc aaactttgtc cctaacatgt actgtgtccg gatactctat 60
 ctcatcagat tttgcgtgga attgg 85
 55 <210> 173
 <211> 82
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 60 <400> 173
 gagtagtcta aaacgcacct taacctattc cgtcggtggt ccctttccaa atcttaccta 60
 65 cccgatgtat agtatgagac cc 82
 <210> 174

ES 2 540 802 T3

<211> 80
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 174
 10 gggctacata tcataactctg ggaacaccag atatcaacc tctctgaaa gccggatcac 60
 aatcactagg gacacgtcga 80
 <210> 175
 15 <211> 83
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 175
 gttagtgatc cctgtgcagc ttctcggta agaaggacgt cgacttgagg caatgtcggg 60
 25 gtctgtgtcg ttgtataatg acg 83
 <210> 176
 <211> 82
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 176
 ccagacacag caacatatta ctgcgtaacc gctggcagag gcttccccta ttggggacag 60
 40 ggcaccctag tgacagttag ca 82
 <210> 177
 <211> 39
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 50 <400> 177
 gtgggatcac tgtcactcgt cgccattcta cctaggcac 39
 <210> 178
 55 <211> 1128
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> sintética
 <400> 178
 ttctaccgtg tggcaccggc cggagacgcg gacccgggtc gagacagggt gtggcgccag 60
 65 tgtaccgtgg aaaagagaag gtcggagggt gttcccgggg tcgcacaagg gggaccgggg 120
 gtcgtcgttc tcgtggctgc cgccgtgtcg gcgggacccg acggaccact tcctgatgaa 180

ES 2 540 802 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30

ggggctcggg cactggcact cgaccttgtc gcctcgggac tggaggccgc acgtgtggaa 240
 ggggcggcac gacgtctcgt cgccggacat gtcggactcg tcgcaccact ggcacgggtc 300
 gtcgtcggac ccgtgggtct ggatgtagac gttgcacttg gtgttcgggt cgttgtggtt 360
 ccacctgttc ttccacctcg ggttctcgac gctgttctgg gtgtggacgg gggggacggg 420
 tcgggggtctc gacgaccgc ctgggaggca caaggacaag ggggggttcg ggttcctgtg 480
 ggactactag tcgtcctggg ggctccactg gacgcaccac cacctgcact cgggtctcct 540
 ggggtctccac ttcaagttaa ccatacacct gccgcacctc cacgtgttgc ggttctgggt 600
 cgggtctctt ctcgtcatgt tgctgtggat gtcccaccac aggcacgact ggcacgacgt 660
 ggtcctgacc gacttgccgt tccttatggt tacgttccag aggttgttcc gggacggtcg 720
 ggggtagctt ttctggtagt cgttccgggt cccggtcggg gccctcgggg tccacatgtg 780
 ggacgggggg agggccctgc tcacgtgggt cttgggtccac agggactgga cagaccactt 840
 cccgaagatg gggtcgctgt agcggcacct caccctctcg ttgccggtcg ggctcttggt 900
 gatgttctgg tgggggggtc acgacctgtc gctgccgtcg aagaaggaca tgtcgttcga 960
 ctggcacctg ttctcgtcca ccgtcgtccc gttgcacaag tcgacgtcgc actacgtgct 1020
 ccgggacgtg ttggtgatgt gggctcttctc ggactcggac agggggccgt tcactactgc 1080
 tgcgccggca cgcttctggt cttaagtaac tagtattagt cggtatgg 1128

35
 <210> 179
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

40 <400> 179

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

45 Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn
 20 25 30

50 Ile Gly Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile
 35 40 45

55 Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Glu Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
 65 70 75 80

60 Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln His Ala Gln Phe Pro Trp
 85 90 95

65 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

ES 2 540 802 T3

<210> 180
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> sintética
 <400> 180
 10 Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 15 Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile Asn Ser Asn
 20 25 30
 20 Ile Gly Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ser Phe Lys Gly Leu Ile
 35 40 45
 25 Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Glu Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 30 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 35 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp
 85 90 95
 40 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 40 <210> 181
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 181
 gaacggcggg ggtacctaac ctgaacctct tatgacaaag aacatcgtcg gcgttgtcca 60
 50 ttccccgacg gtttagggtc 80
 55 <210> 182
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 60 <400> 182
 aaggggctgc caaatcccag tgaggaggaa gggatcgaag gtgaccatcg aagccagtca 60
 65 agggggcttc catccactcc 80
 <210> 183
 <211> 80

	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220> <223> oligonucleótido sintético		
	<400> 183	tccccgaag gtaggtgagg acacagaaga gatgtccaca agtgtcacta taagtctact	60
10		gagtctcagg taggtcgtac	80
15	<210> 184 <211> 82 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> oligonucleótido sintético		
	<400> 184	gttcggttct gtagttgagg ttataaccta ccgaggttgt cttcggacca ttcaggaagt	60
25		ttcctgatta gatagtgctt tg	82
30	<210> 185 <211> 80 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
35	<220> <223> oligonucleótido sintético		
	<400> 185	gaccgtcgcc ctggctgata tgtgactggt agagatcgaa tctcggctctt ctgaaacggt	60
40		gtatgatgac gcaggtcgtg	80
45	<210> 186 <211> 80 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
50	<220> <223> oligonucleótido sintético		
	<400> 186	catactactg cgtccagcac gctcagttcc cctggacatt cggcggcggc acaaaactgg	60
55		aaatcaaacg tgagtaggga	80
60	<210> 187 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
65	<220> <223> oligonucleótido sintético		
	<400> 187	ccttttagttt gcactcatcc ctaggctc	28
	<210> 188 <211> 233		

ES 2 540 802 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> sintética

<400> 188

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

15 Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val
 20 25 30

20 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys His Ser Ser Gln Asp Ile
 35 40 45

25 Asn Ser Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Lys
 50 55 60

30 Gly Leu Ile Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp Gly Val Pro Ser Arg
 65 70 75 80

35 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 85 90 95

40 Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln
 100 105 110

45 Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
 115 120 125

50 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 130 135 140

55 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Val Tyr Pro
 145 150 155 160

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

65 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 180 185 190

70 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys Gly
 195 200 205

75 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln His Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220

80 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

ES 2 540 802 T3

	<210>	189					
	<211>	704					
	<212>	ADN					
	<213>	Secuencia artificial					
5	<220>						
	<223>	sintética					
	<400>	189					
10	atggtgtcca	cagctcagtt	ccttgcattc	ttgttgcttt	ggtttccagg	tgcaagatgt	60
	gacatcctga	tgaccaatc	tccatcctcc	atgtctgtat	ctctgggaga	cacagtcagc	120
	atcacttgcc	attcaagtca	ggacattaac	agtaatatag	ggtgggtgca	gcagagacca	180
15	gggaaatcat	ttaagggcct	gatctatcat	ggaaccaact	tggacgatga	agttccatca	240
	aggttcagtg	gcagtgatc	tggagccgat	tattctctca	ccatcagcag	cctggaatct	300
20	gaagattttg	cagactatta	ctgtgtacag	tatgctcagt	ttccgtggac	gttcggtgga	360
	ggcaccaagc	tggaaatcaa	acgaactgtg	gctgcaccat	ctgtcttcat	cttcccgccca	420
	tctgatgagc	agttgaaatc	tggaactgcc	tctgtttgtg	gcctgctgaa	taacttctat	480
25	cccagagagg	caaagtaca	gtggaagggtg	gataacgcc	tccaatcggg	taactcccag	540
	gagagtgtca	cagagcagga	cagcaaggac	agcacctaca	gcctcagcag	caccctgacg	600
30	ctgagcaaag	cagactacga	gaaacacaaa	gtctacgcct	gcgaagtcac	ccatcagggc	660
	ctgagctcgc	ccgtcacaaa	gagcttcaac	aggggagagt	gttg		704
35	<210>	190					
	<211>	702					
	<212>	ADN					
	<213>	Secuencia artificial					
40	<220>						
	<223>	sintética					
	<400>	190					
45	atggattgga	cttggagaat	actgtttctt	gtagcagccg	caacaggtgt	tcacagtgat	60
	attcagatga	ctcagagtcc	atccagcatg	tcagtctccg	tgggagatag	ggtgacgata	120
	acctgtcatt	caagccaaga	catcaactcc	aatattggat	ggctccaaca	gaagcctggt	180
50	aagtccttca	aaggactaat	ctatcacgga	acaaacttgg	acgacggcgt	gccatcgaga	240
	ttttcagggg	ctggcagcgg	gaccgactat	acactgacca	tctctagctt	acaaccagag	300
	gactttgccca	catactactg	cgtccagtac	gctcagttcc	cctggacatt	cggcggcggc	360
55	acaaaactgg	aatcaaacg	aaccgtcgca	gctccctccg	tgttcatctt	cccccatcc	420
	gacgagcaac	tgaagtcagg	cacagcctcc	gtgggtgtgcc	tccttaataa	cttttaccba	480
60	agagaggcca	aagtccagtg	gaaagtggac	aacgcactac	agagcgggaa	ctctcaggaa	540
	agcgtgacag	agcaggactc	aaaagattca	acatacagcc	tatcttctac	cctgacactg	600
	tcaaaagctg	attatgaaaa	gcacaaagta	tatgcctgtg	aagtaactca	tcagggactc	660
65	agcagccctg	tcactaaaag	ttttaataga	ggcgaatgct	ga		702

ES 2 540 802 T3

<210> 191
 <211> 408
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> sintética
 <400> 191
 10 gccaccatga gagtgctgat tcttttgtgg ctgttcacag cctttcctgg tgtcctgtct 60
 gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctagc ctggtgaaac cttctcagac tctgtccctc 120
 acctgcactg tcaactgcta ctcaatcacc agtgattttg cctggaactg gatccggcag 180
 15 tttccaggaa acaagctgga gtggatgggc tacataagtt atagtggtaa cactaggtac 240
 aacccatctc tcaaaagtcg aatctctatc actcgagaca catccaagaa ccaattcttc 300
 20 ctgcagttga attctgtgac tattgaggac acagccacat attactgtgt aacggcggga 360
 cgcggtttc cttattgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgca 408
 <210> 192
 <211> 405
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> sintética
 <400> 192
 35 atggattgga cctggcgcac tctctttctg gtagcagccg ccacaggtgt ccacagccag 60
 gtgcagctcc aagagagtgg acctgggctt gtcaagccga gtcaaacttt gtcctaaca 120
 tgtactgtgt ccggatactc tatctcatca gattttgcgt ggaattggat aaggcagcca 180
 40 ccagggaaag gtttagaatg gatgggctac atatcact ctgggaacac cagatatcaa 240
 ctttctctga aaagccggat cacaatctca agggacacgt cgaagaatca gttcttctg 300
 aaactgaact ccgttacagc cgagacaca gcaacatatt actgcgtaac cgctggcaga 360
 45 ggcttcccct attggggaca gggcacccta gtgacagtga gcagc 405
 <210> 193
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 193
 55 Tyr His Gly Thr Asn Leu Asp Asp
 1 5
 <210> 194
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 65 <400> 194
 Tyr His Gly Thr Asn Leu Glu Asp
 1 5

<210> 195
<211> 9
5 <212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 195

10 Val Gln Tyr Ala Gln Phe Pro Trp Thr
1 5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo anti-receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) aislado, en el que dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 164 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 166.
- 10 2. Anticuerpo aislado, según la reivindicación 1, en el que la región variable de cadena pesada está unida en su extremo C-terminal a una región constante de cadena pesada de isotipo IgG.
3. Anticuerpo aislado, según la reivindicación 2, en el que dicho isotipo de IgG es un isotipo IgG1.
- 15 4. Anticuerpo aislado, según la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en el que la región variable de cadena ligera está unida en su extremo C-terminal a una región constante de cadena ligera kappa.
5. Anticuerpo aislado, según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 43.
- 20 6. Anticuerpo aislado, según la reivindicación 1 o la reivindicación 5, en el que dicho anticuerpo comprende una región constante de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 48.
7. Anticuerpo aislado, según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es la forma de un anticuerpo F(ab')₂, fragmento scFv, diacuerpo, triacuerpo o tetracuerpo.
- 25 8. Anticuerpo aislado, según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende además un marcador detectable o funcional.
9. Anticuerpo aislado, según la reivindicación 8, en el que dicho marcador detectable o funcional es un fármaco unido covalentemente.
- 30 10. Anticuerpo aislado, según la reivindicación 8, en el que dicho marcador funcional es un fármaco citotóxico.
11. Anticuerpo aislado, según la reivindicación 8, en el que dicho marcador detectable es un marcador radioactivo.
- 35 12. Anticuerpo aislado, según la reivindicación 8, en el que dicho marcador radioactivo se selecciona del grupo que consiste en ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ³⁶Cl, ⁵¹Cr, ⁵⁸Co, ⁵⁹Fe, ⁹⁰Y, ¹²¹I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹¹¹In, ²¹¹At, ¹⁹⁸Au, ⁶⁷Cu, ²²⁵Ac, ²¹³Bi, ⁹⁹Tc y ¹⁸⁶Re.
- 40 13. Anticuerpo aislado, según la reivindicación 8, en el que dicho marcador detectable es un agente formador de imágenes.
14. Anticuerpo aislado, según la reivindicación 13, en el que dicho agente formador de imágenes es un agente potenciador de las imágenes de resonancia magnética.
- 45 15. Anticuerpo aislado, según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que dicho anticuerpo aislado está pegilado.
- 50 16. Kit para el diagnóstico de un tumor en el que EGFR se expresa de manera aberrante o EGFR se expresa en forma de una proteína truncada, en el que el kit comprende el anticuerpo aislado, según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, y en el que el kit comprende opcionalmente reactivos y/o instrucciones para su uso.
17. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo aislado, según cualquiera de las reivindicaciones 1-15.
- 55 18. Composición farmacéutica, según la reivindicación 17, que comprende además un agente contra el cáncer seleccionado del grupo que consiste en un agente quimioterapéutico, un anticuerpo anti-EGFR, un agente radioinmunoterapéutico y combinaciones de los mismos.
- 60 19. Composición farmacéutica, según la reivindicación 18, en la que dicho agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de tirosina quinasa, un inhibidor de la cascada de fosforilación, un modulador post-traducciona, un inhibidor del crecimiento o división celular, un antimitótico, un inhibidor de la transducción de señales, y combinaciones de los mismos.
20. Composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones 17-19, para utilizar en la prevención y/o tratamiento del cáncer en mamíferos.

21. Composición farmacéutica para utilizar, según la reivindicación 20, en el que dicho cáncer es un cáncer que reside en el cerebro que produce EGFR expresado de manera aberrante en mamíferos.
- 5 22. Composición farmacéutica para utilizar, según la reivindicación 20, en el que dicho cáncer es un cáncer que reside en el cerebro seleccionado del grupo que consiste en glioblastomas, meduloblastomas, meningiomas, astrocitomas neoplásicos y malformaciones arteriovenosas neoplásicas.
- 10 23. Composición farmacéutica para utilizar, según la reivindicación 20, en el que dicho cáncer es un tumor sólido primario o secundario.
24. Composición farmacéutica para utilizar, según la reivindicación 20, en el que dicho cáncer es un tumor de glioma.
- 15 25. Composición farmacéutica para utilizar, según la reivindicación 20, en el que dicho cáncer es un tumor seleccionado del grupo que consiste en un tumor de mama, un tumor de pulmón, un tumor de próstata, un tumor de vejiga, un tumor de cabeza y un tumor de cuello.
- 20 26. Composición farmacéutica para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones 20-25, a utilizar en combinación con un segundo agente.
- 25 27. Composición farmacéutica para utilizar, según la reivindicación 26, en el que dicho segundo agente se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor de tirosina quinasa, doxorubicina, temozolomida, cisplatino, carboplatino, nitrosoureas, procarbazona, vincristina, hidroxurea, 5-fluorouracilo, citosina arabinósido, ciclofosfamida y epipodofilotoxina, carmustina, lomustina.
- 30 28. Composición farmacéutica para utilizar, según la reivindicación 20, a utilizar en combinación con temozolomida.
- 35 29. Huésped unicelular transformado con una molécula de ADN recombinante que codifica un anticuerpo aislado, según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, opcionalmente en el que el huésped unicelular se selecciona del grupo que consiste en células de E. coli, Pseudomonas, Bacillus, Streptomyces, levaduras, CHO, YB/20, NSO, SP2/0, R1.1, B-W, L-M, COS 1, COS 7, BSC1, BSC40 y BMT10, células vegetales, células de insectos y células humanas en cultivo de tejidos.
- 30 30. Inmunoconjugado que comprende un agente citotóxico y un anticuerpo aislado, según cualquiera de las reivindicaciones 1-15.

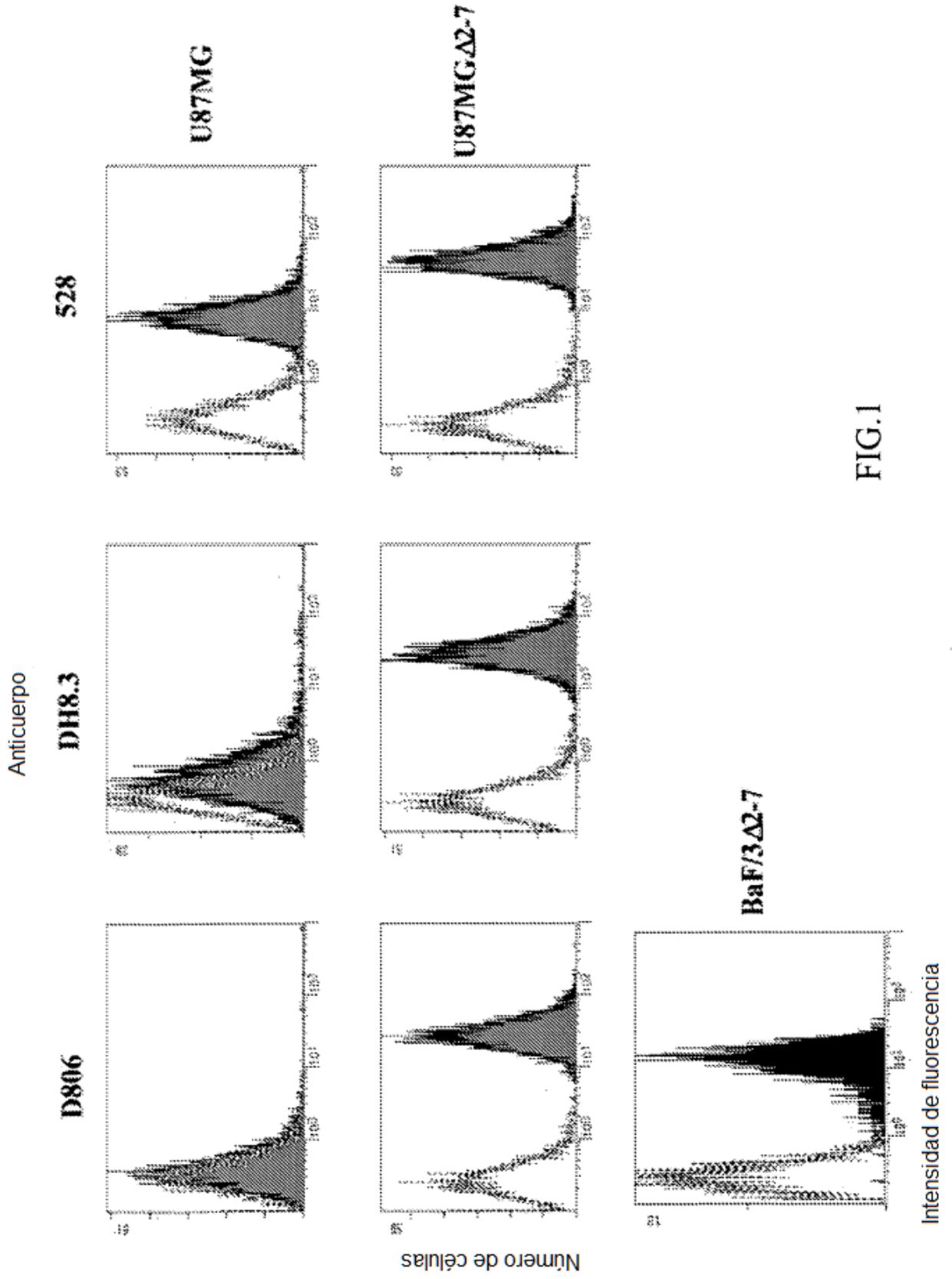
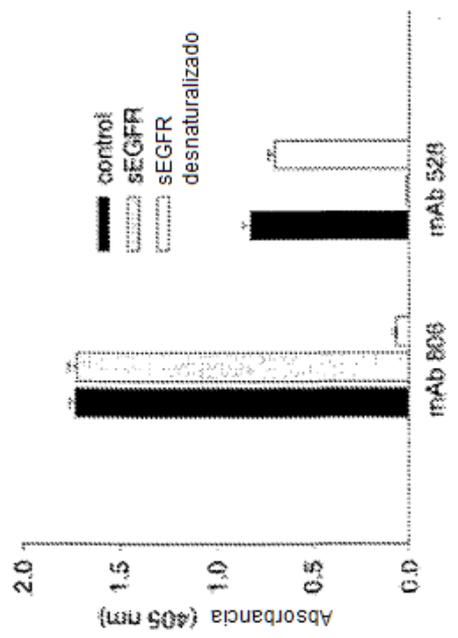
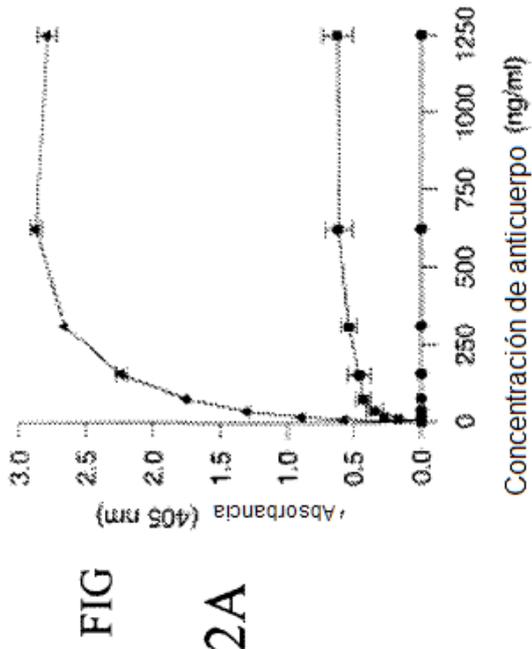
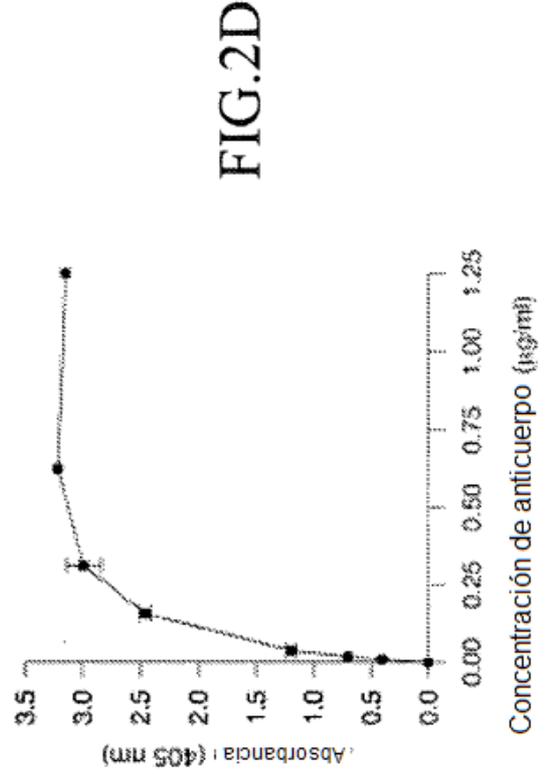
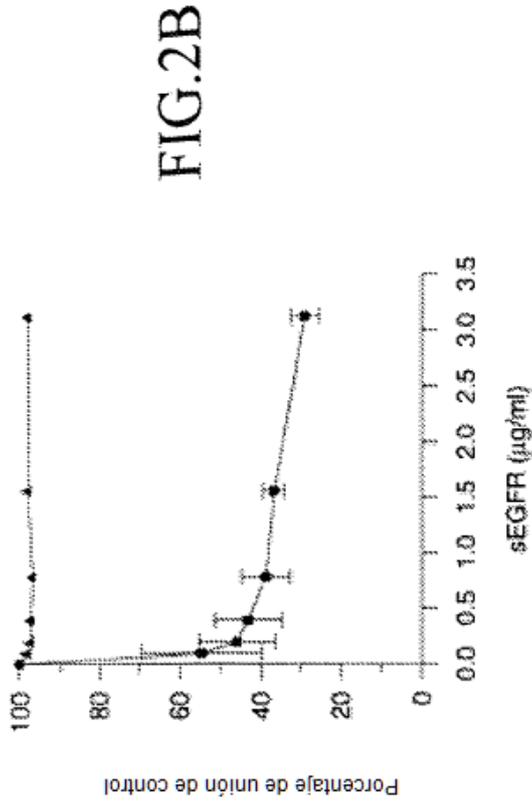


FIG.1



FIG

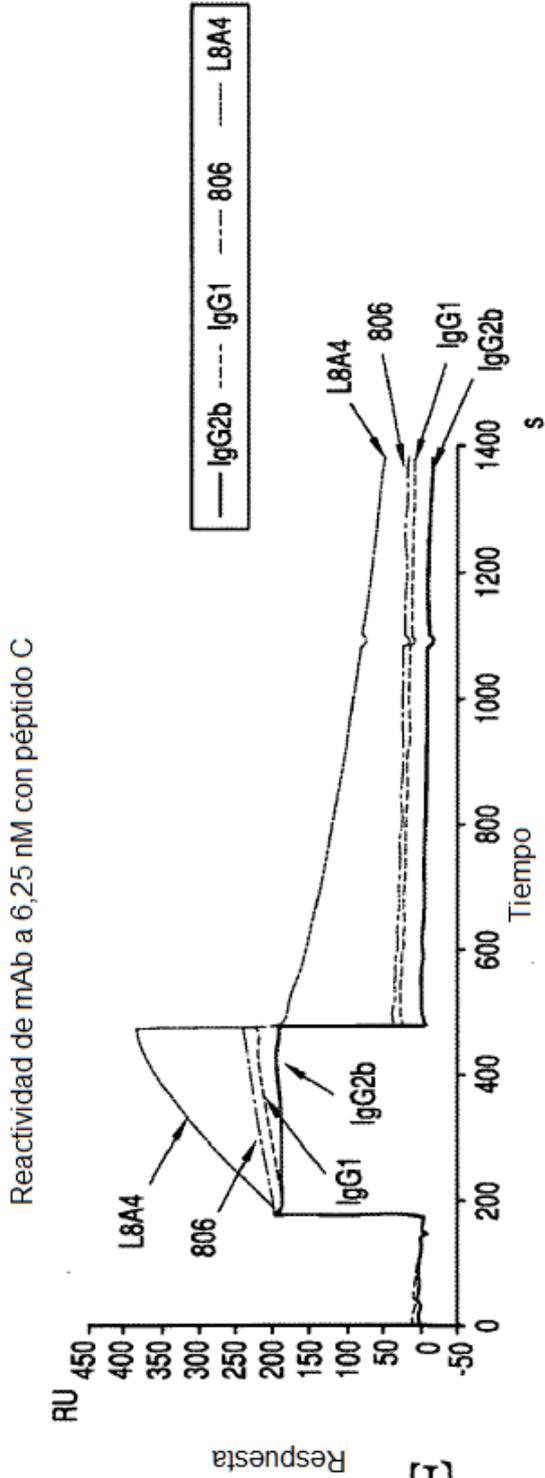


FIG. 2E

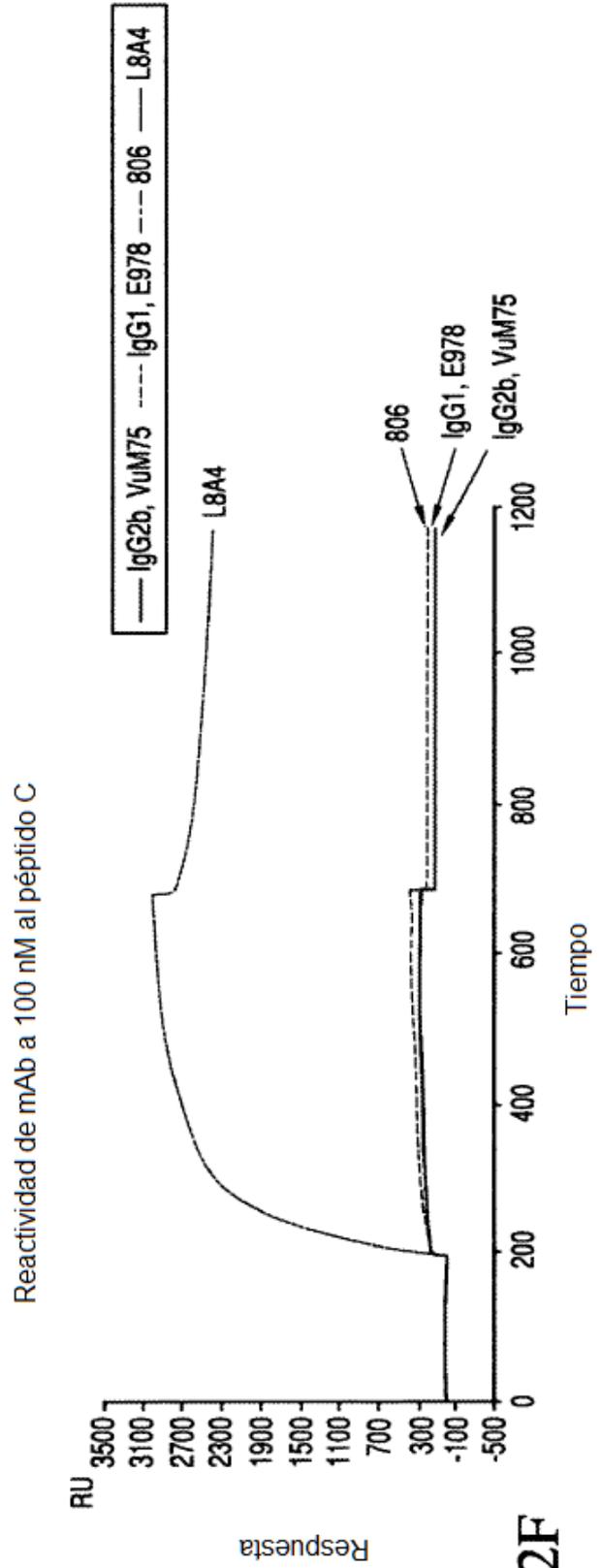


FIG. 2F

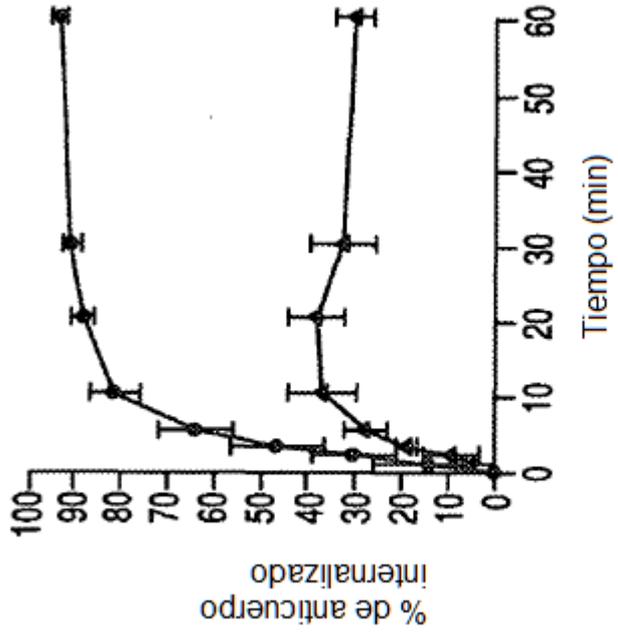


FIG. 3

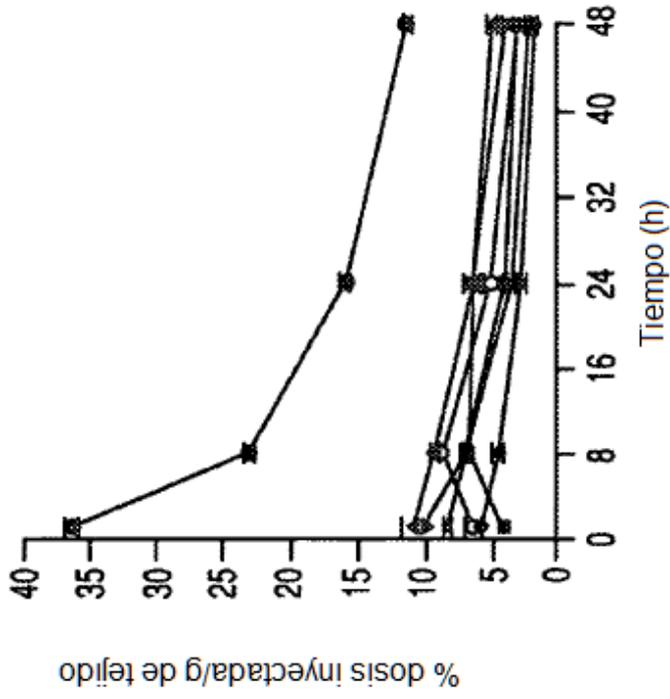


FIG. 4B

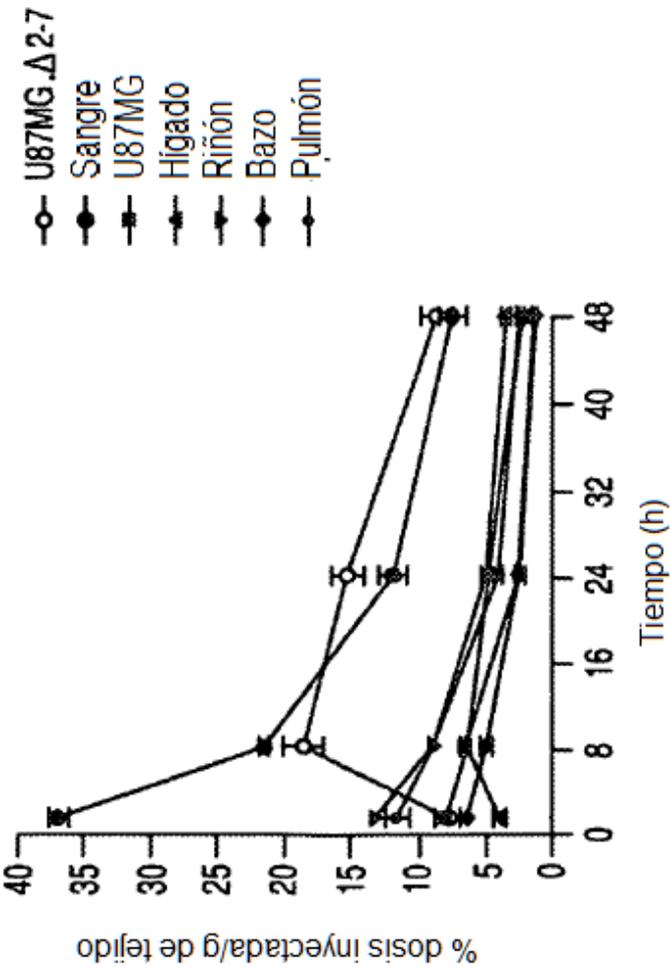


FIG. 4A

- U87MG Δ 2-7
- Sangre
- U87MG
- ◆ Hígado
- ▼ Riñón
- ◆ Bazo
- Pulmón

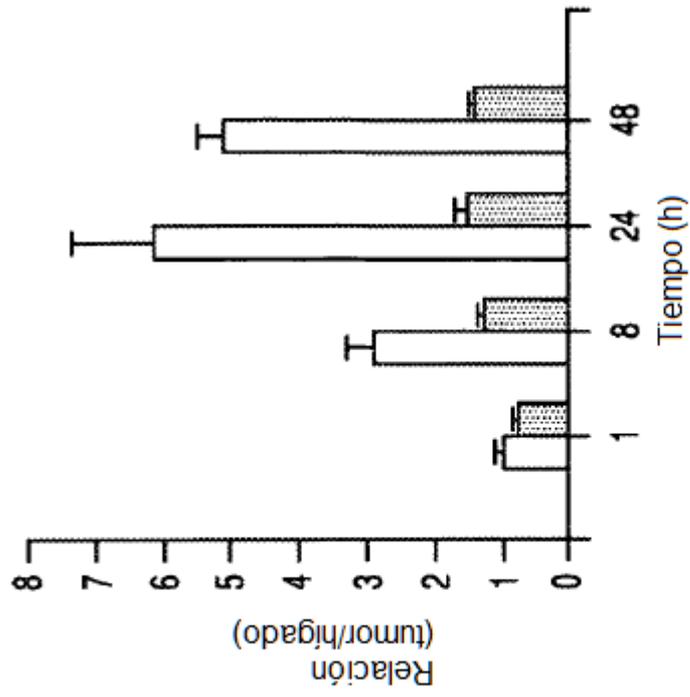


FIG. 5B

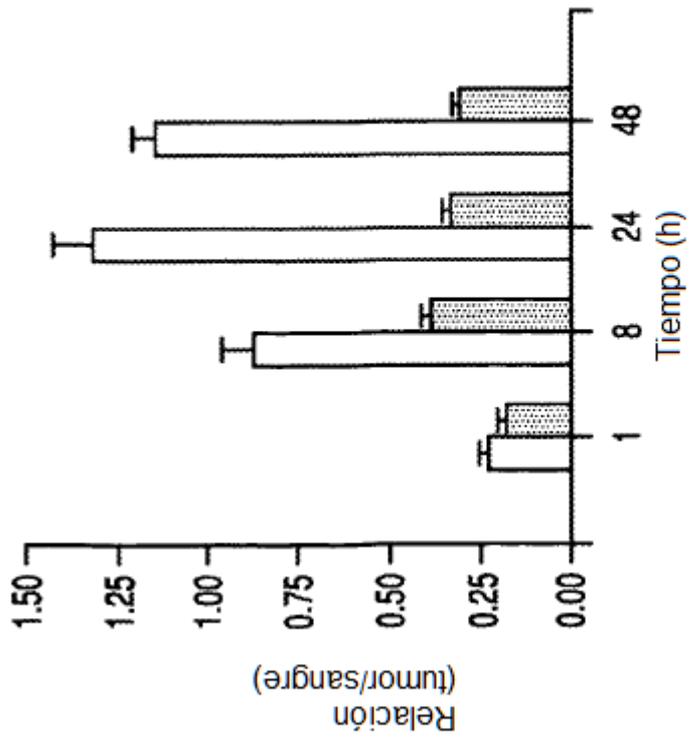


FIG. 5A

FIG. 6A

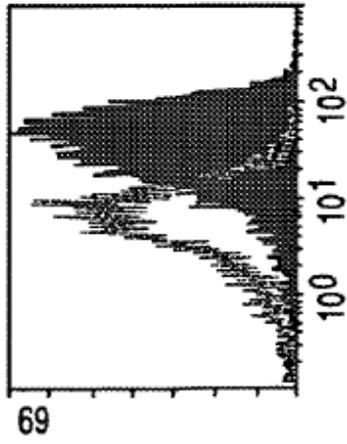


FIG. 6B

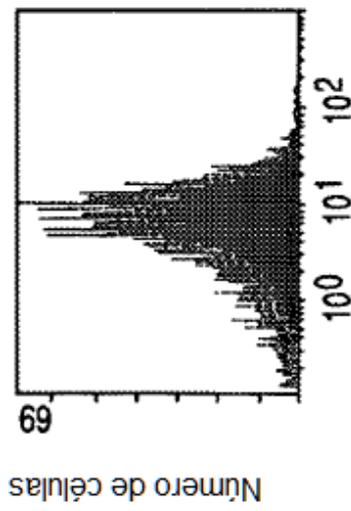
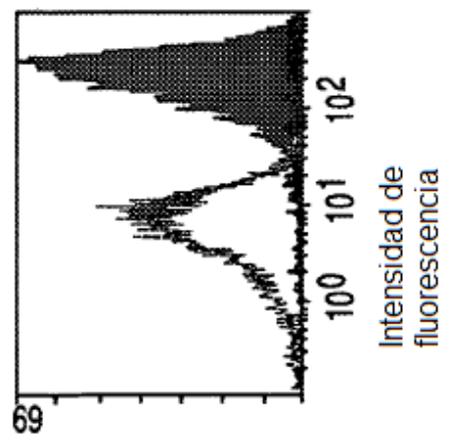


FIG. 6C



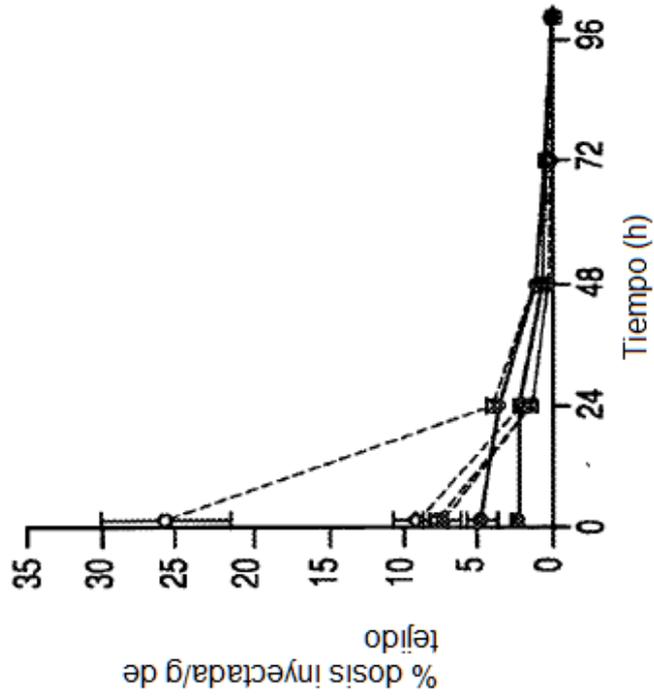


FIG. 7B

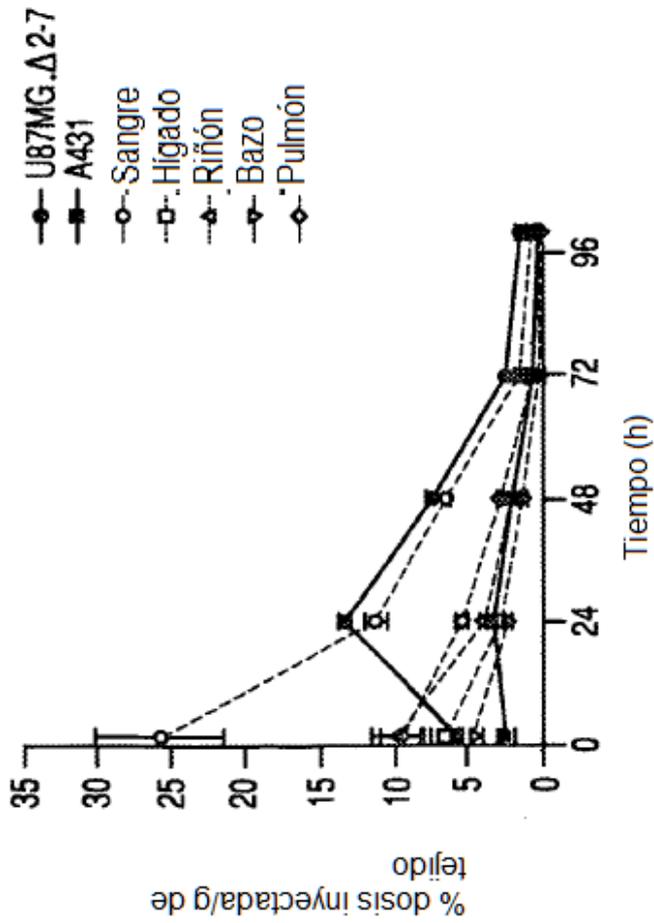


FIG. 7A

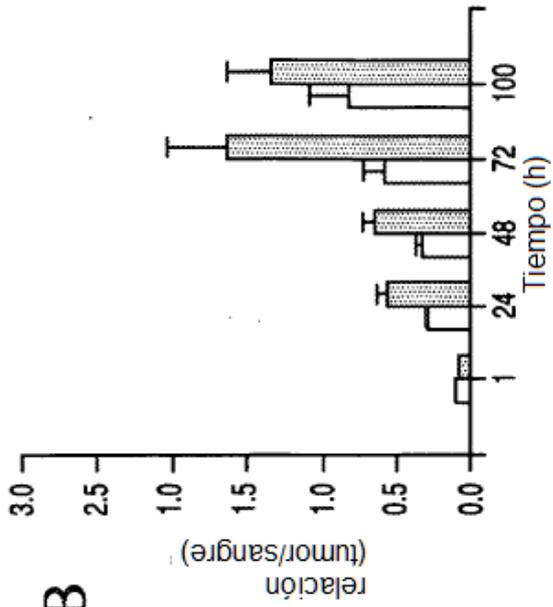


FIG. 8B

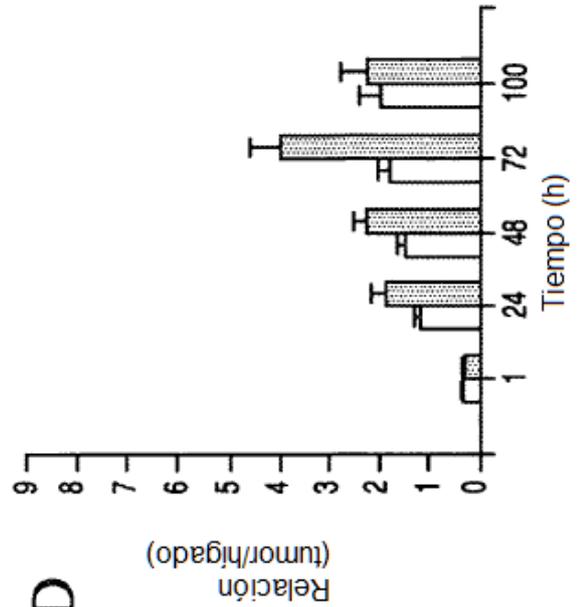


FIG. 8D

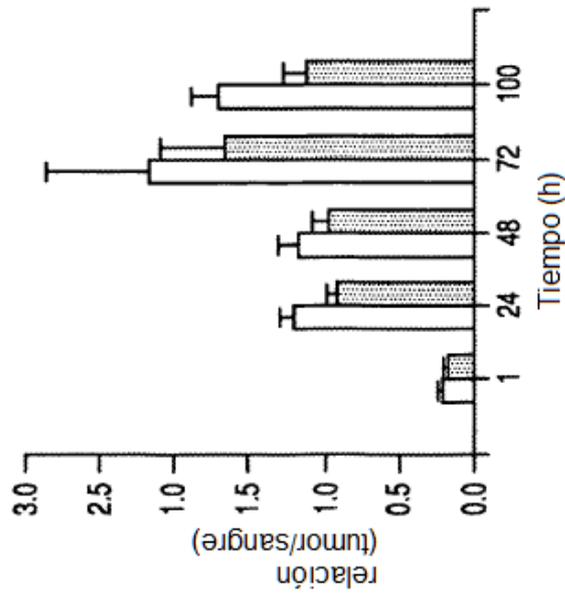


FIG. 8A

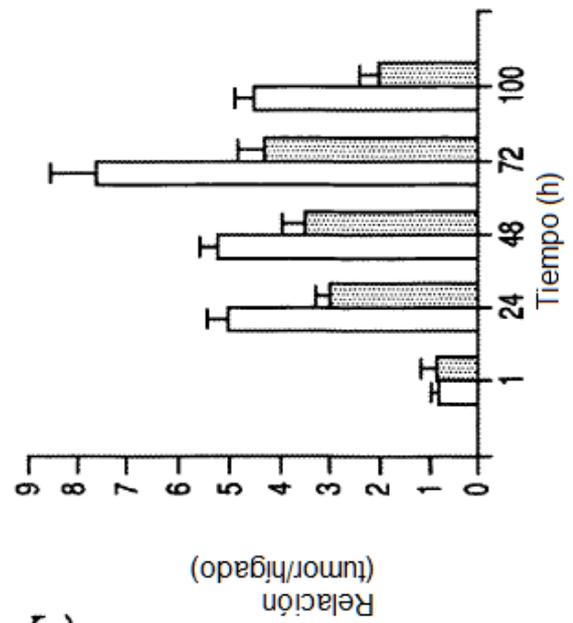


FIG. 8C

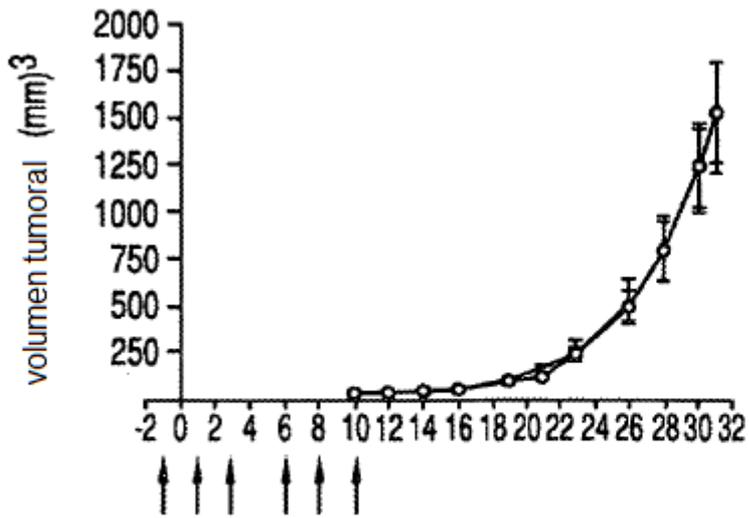


FIG. 9A

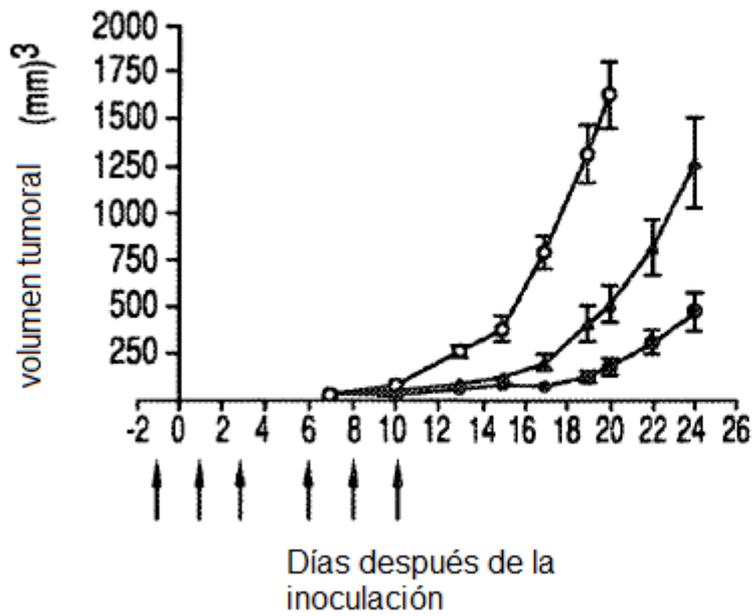


FIG. 9B

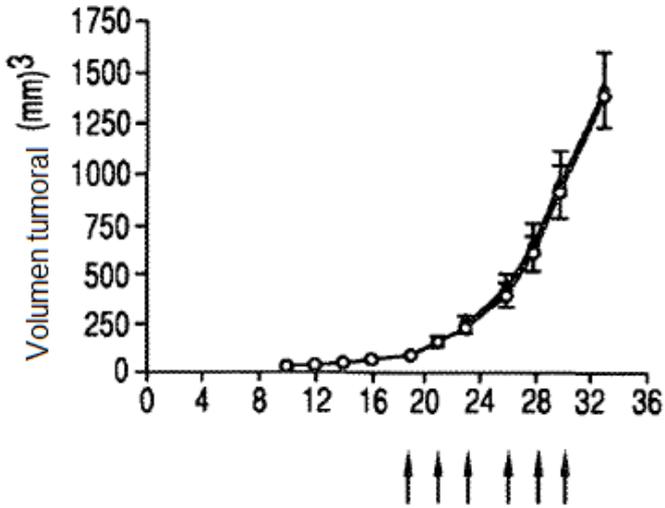


FIG. 10A

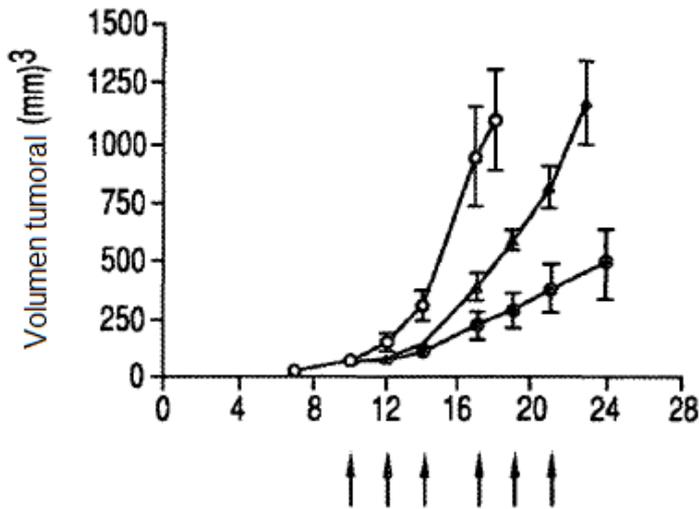


FIG. 10B

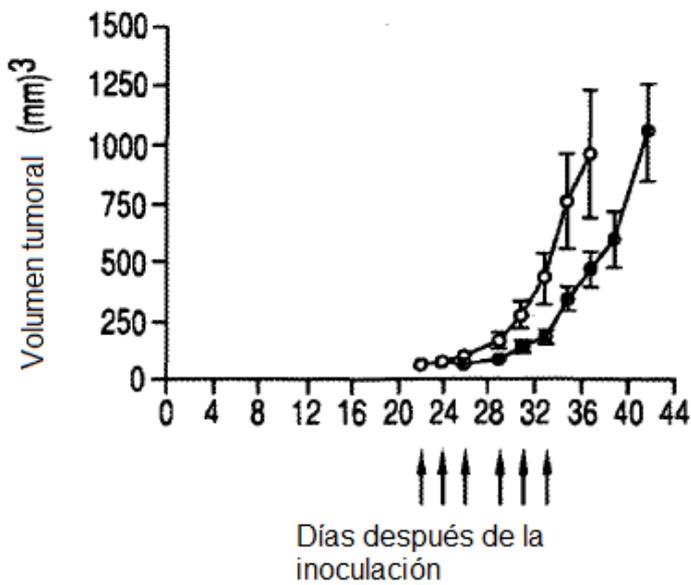


FIG. 10C

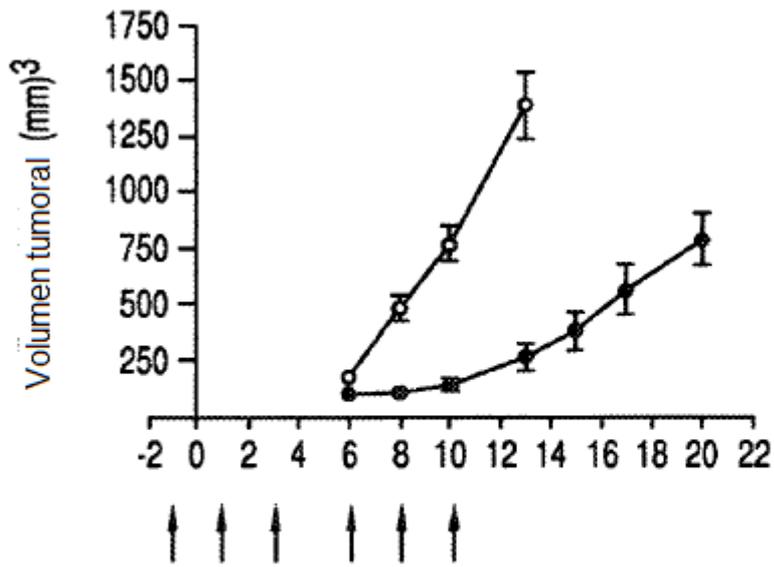


FIG. 11A

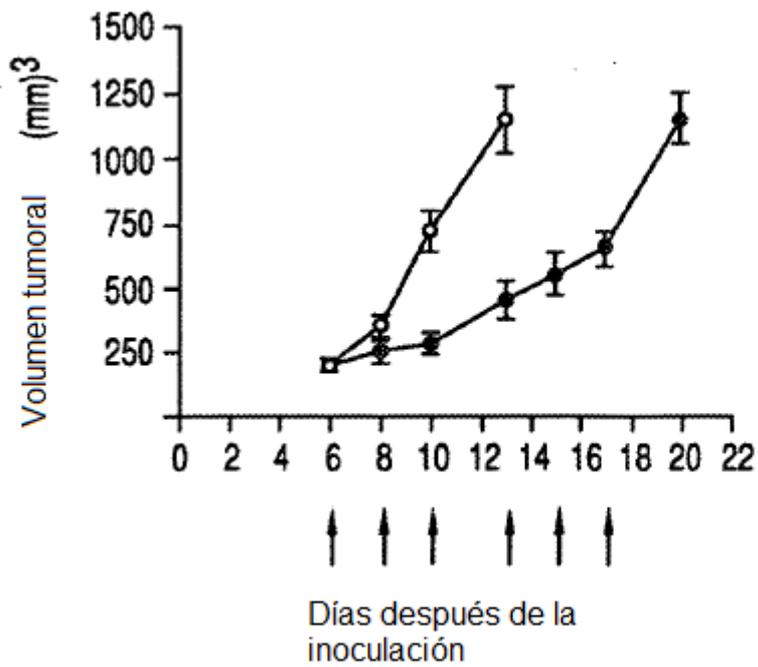


FIG. 11B

TRATAMIENTO DE XENOINJERTOS DE A431 CON mAb 806 y AG1478

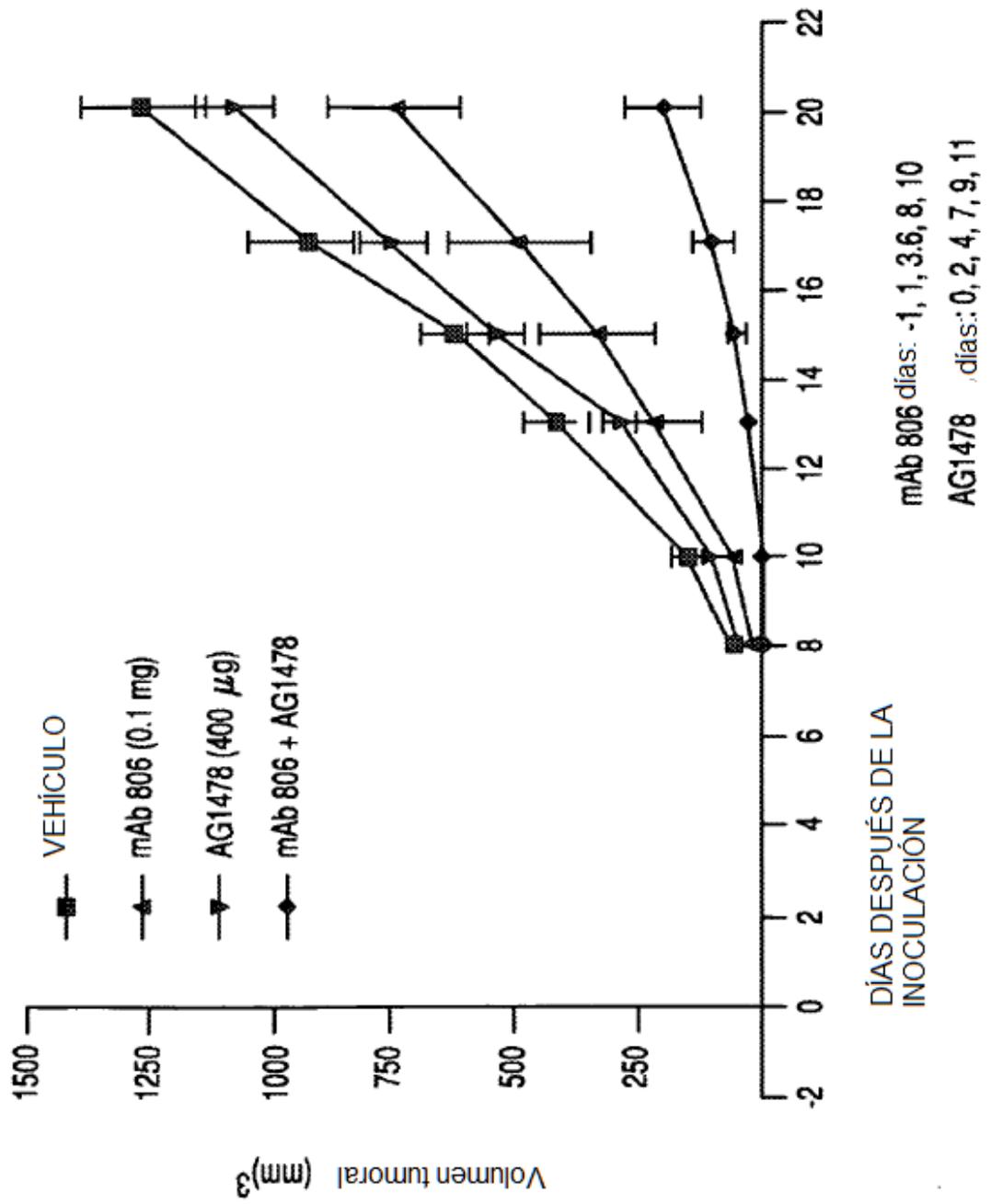


FIG. 12

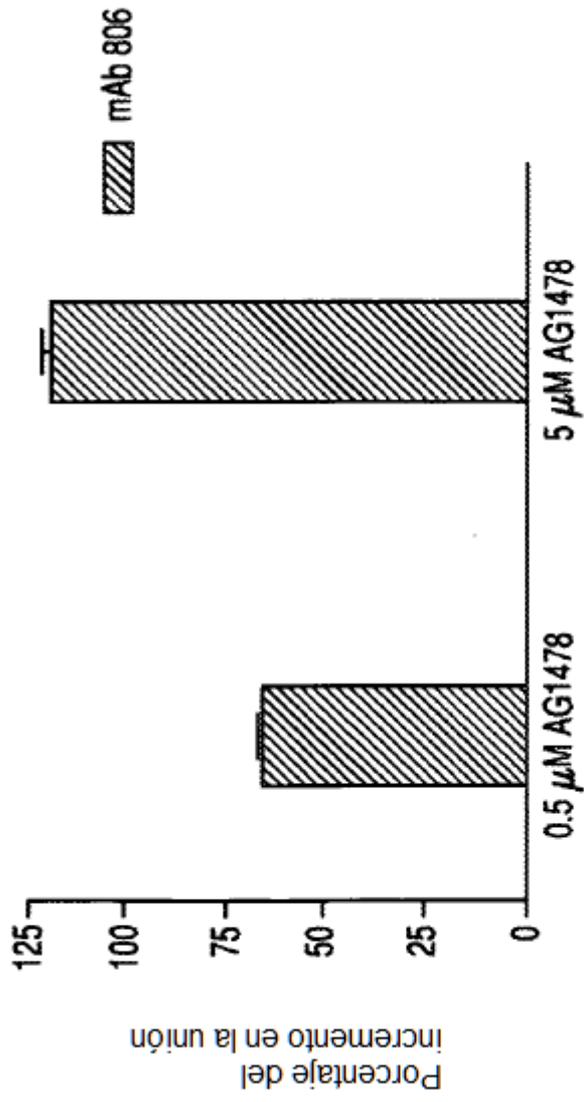


FIG. 13

cadena de VH de mAb806 (incluyendo péptido señal): secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos

Ácido nucleico

ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTGGCTGTTACACAGCCTTTCCTGGTGTCCCTGTCTGATG
TGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTAGCCTGGTCAAACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTCA
CCTGCACTGTCCTGGCTACTCAATCACCAGTGATTTTGCCTGGAAGTGGATCCGGC
AGTTTCCAGGAAACAAGCTGGAGTGGATGGGCTACATAAGTTATAGTGGTAACT
AGGTACAACCCATCTCTCAAAGTCAATCTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAAC
CAATTCTCCTGCAGTTGAATTCTGTGACTATTGAGGACACAGCCACATATTACTGT
GTAACGGCGGGACGCGGGTTTCCTTATTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCT
GCA (SEQ ID NO:1)

FIG.14A

Aminoácido

MRVLILLWLFTAAPGVLS DVQLQESGPSLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDFAWNWIRQFP
péptido señal
GNKLEWMGYISYSGNTRYNPSLKSRIITRDTSKNQFFLQLNSVTIEDTATYYCVTAGRG
FPYWGQGLVTVSA (SEQ ID NO:2)

FIG.14B

Cadena VL de mAb806 (incluyendo péptido señal): secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos

Secuencia de ácidos nucleicos

ATGGTGTCCACAGCTCAGTTCCTTGCATTCTTGTTGCTTTGGTTTCCAGGTGCAAGAT
GTGACATCCTGATGACCCAATCTCCATCCTCCATGTCTGTATCTCTGGGAGACACAG
TCAGCATCACTTGCCATTCAAGTCAGGACATTAACAGTAATATAGGGTGGTTGCAGC
AGAGACCAGGGAAATCATTTAAGGGCCTGATCTATCATGGAACCAACTTGGACGAT
GAAGTTCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGAGCCGATTATTCTCTCACCATC
AGCAGCCTGGAATCTGAAGATTTTGCAGACTATTACTGTGTACAGTATGCTCAGTTT
CCGTGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGT (SEQ ID NO:3)

FIG.15A

Secuencia de aminoácidos

MVSTAQFLAFLLLWFPGARCDILMTQSPSSMSVSLGDTVSICHSSQDINSNIGWLQGRP
Péptido señal
GKSFKGLIYHG^{TN}LDDEVPSRFSGSGSGADYSLTISSE^{DF}ADYYCVQYAQFPWTFGG
GTKLEIKR (SEQ ID NO:4)

FIG.15B

Cadena HL de mAb806 (sin péptido señal): Secuencia de aminoácidos

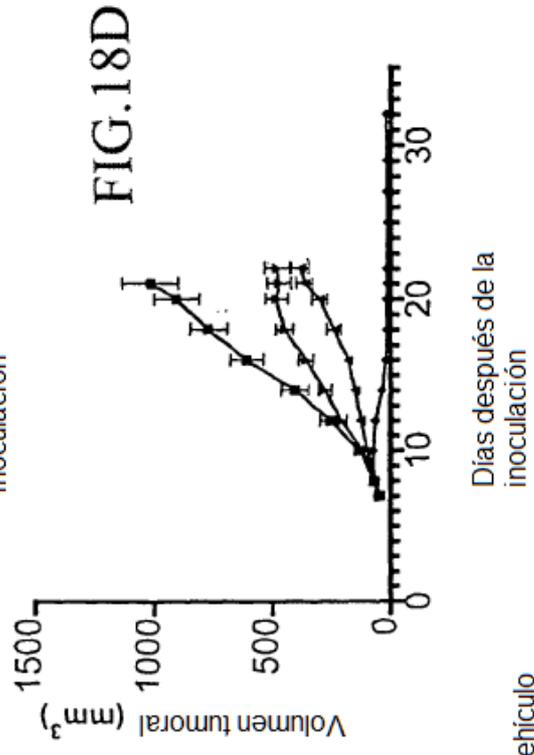
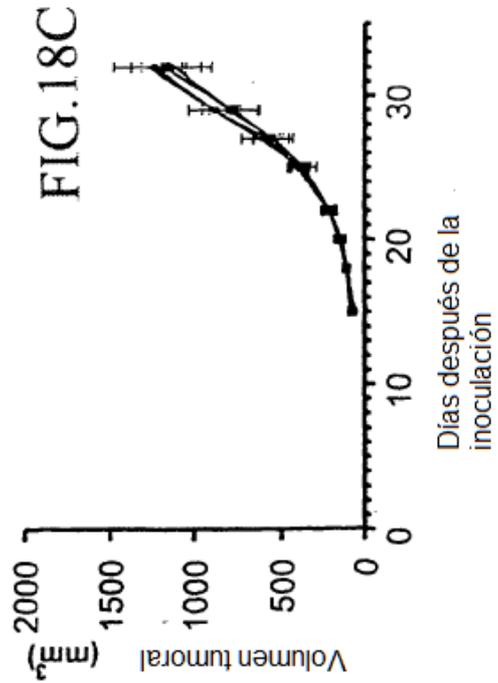
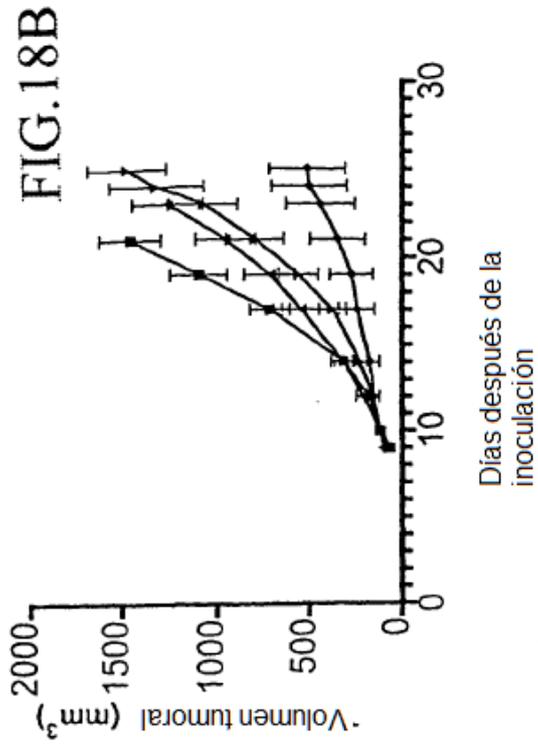
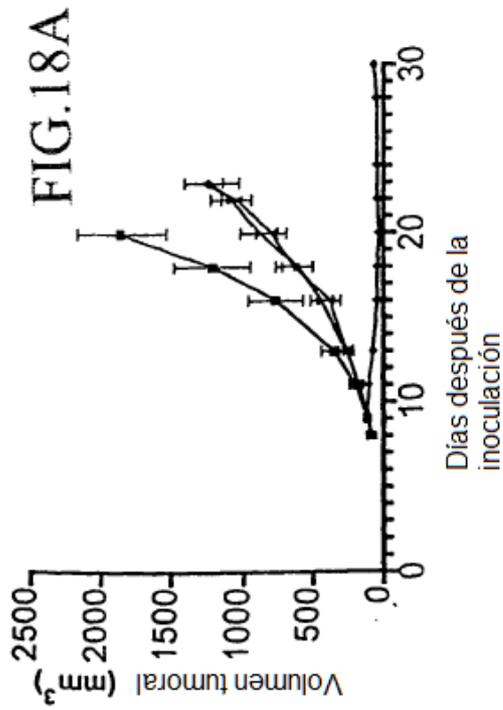
DVQLQESG PSLVKPSQSLTCTVTGYSITSDFAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGNTRYNPSLKSRISITTRDTSKNQFFLQLN
CDR1 *CDR2*
SVTIEDTATYYCYC VTAGRGFPYWGQGITLVTVSA (SEQ ID NO:11)
CDR3

FIG.16

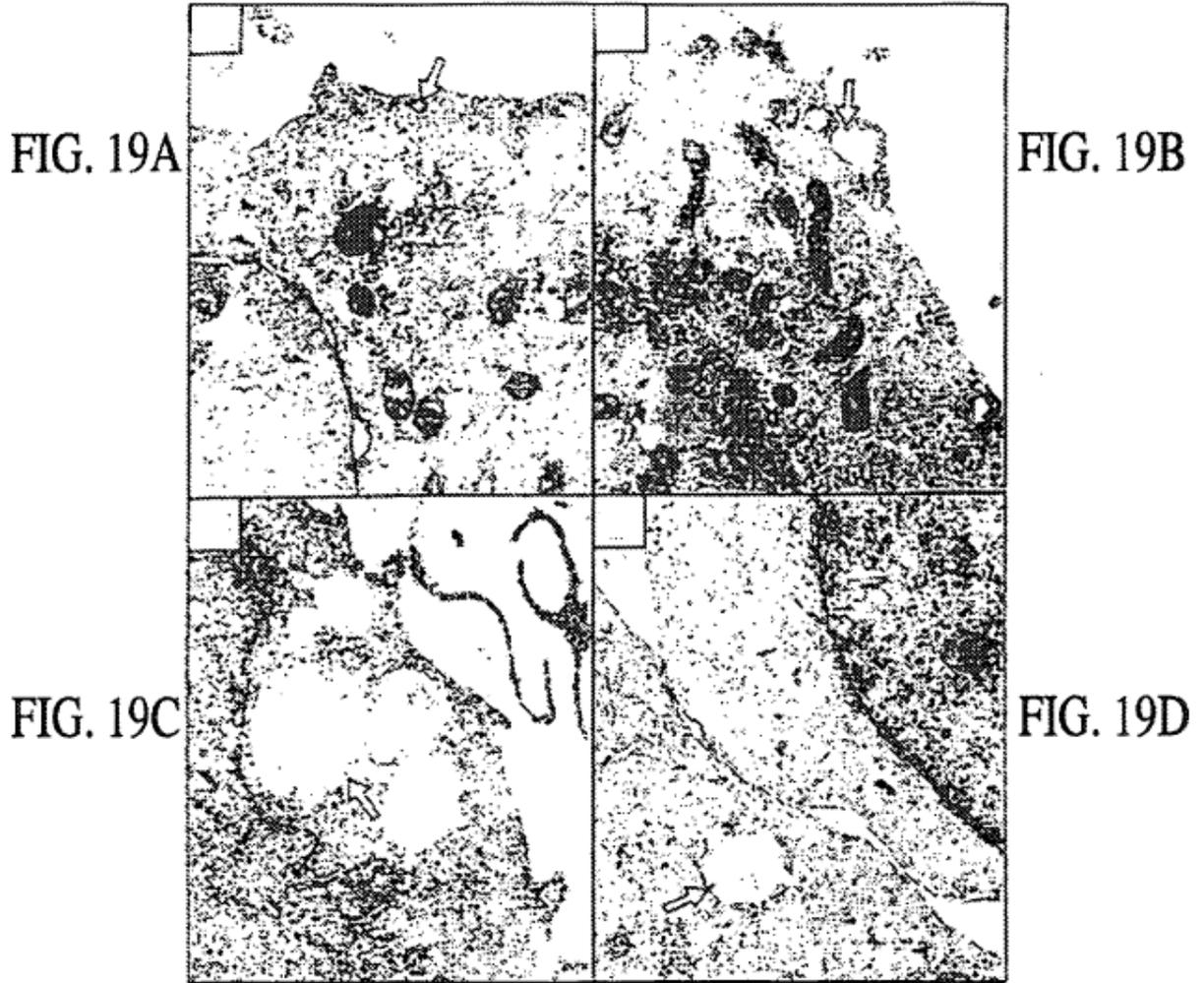
Cadena de VL de mAb806 (Sin péptido señal): secuencia de aminoácidos

DILMTQSPSSMSVSLGDTVSIITCHSSQDINSNIGWLQQRPGKSFKGLIYHGTLNLDDEVPSRFRSGSGGADYSLTISSLESEDFAD
CDR1
YYCVOYAOFPWFEGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:12)
CDR3

FIG.17



- Vehículo
- ▲— 528
- 806
- ◆— 528 + 806



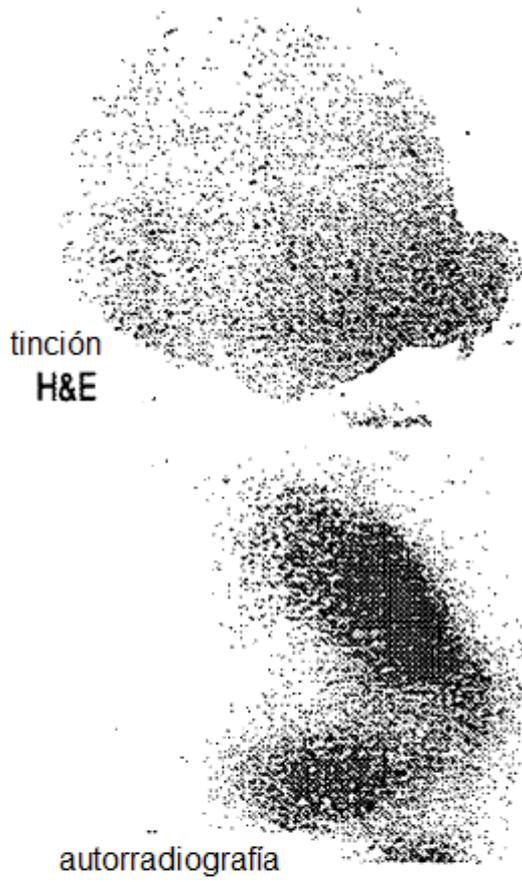


FIG. 20

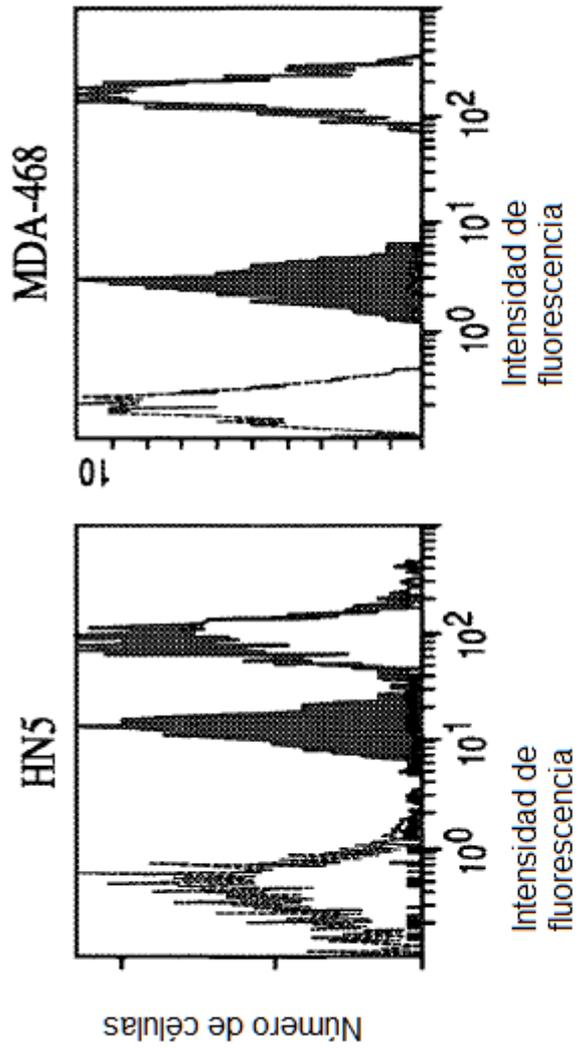


FIG. 21

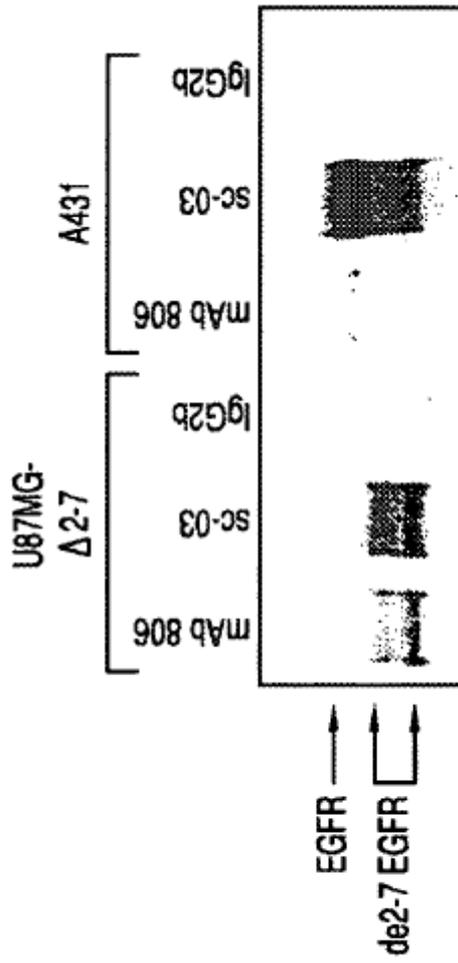


FIG. 22

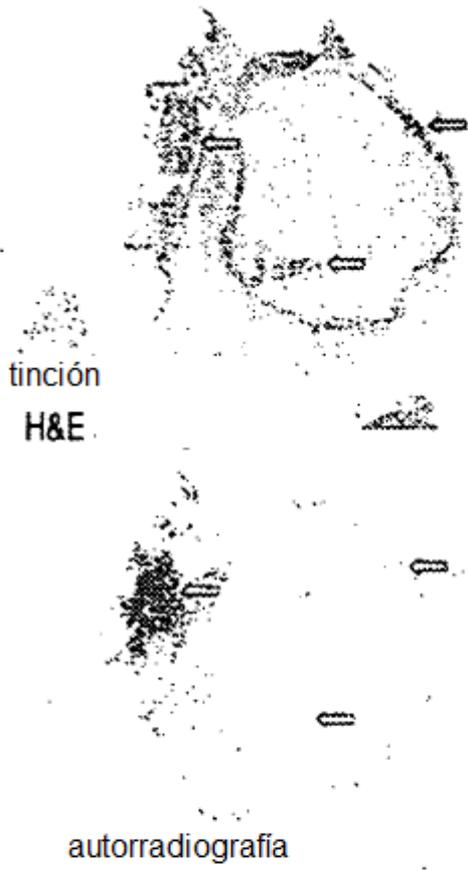


FIG. 23

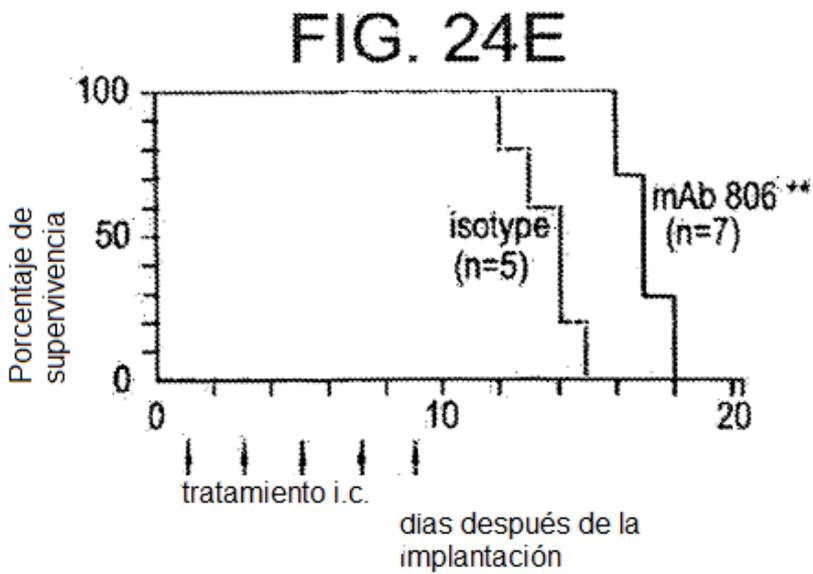
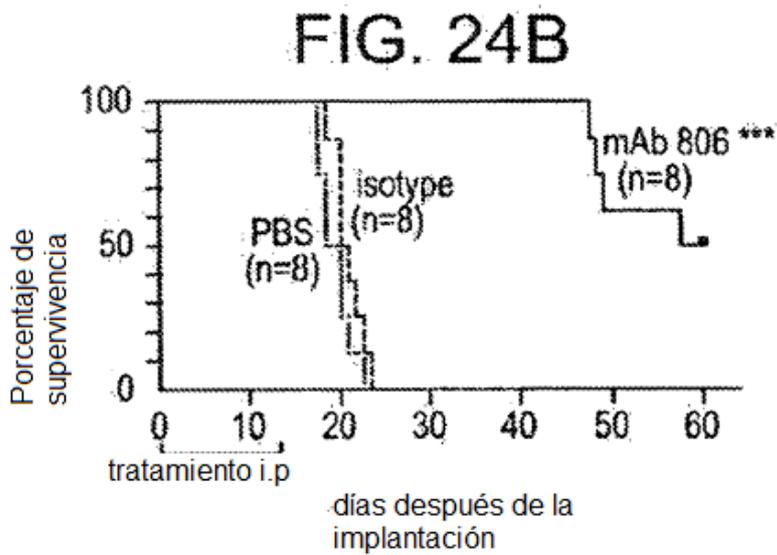
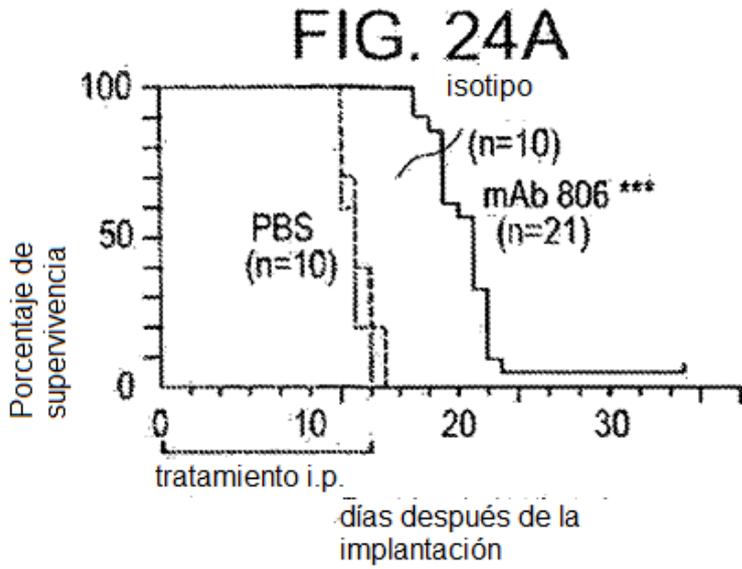


FIG. 24C

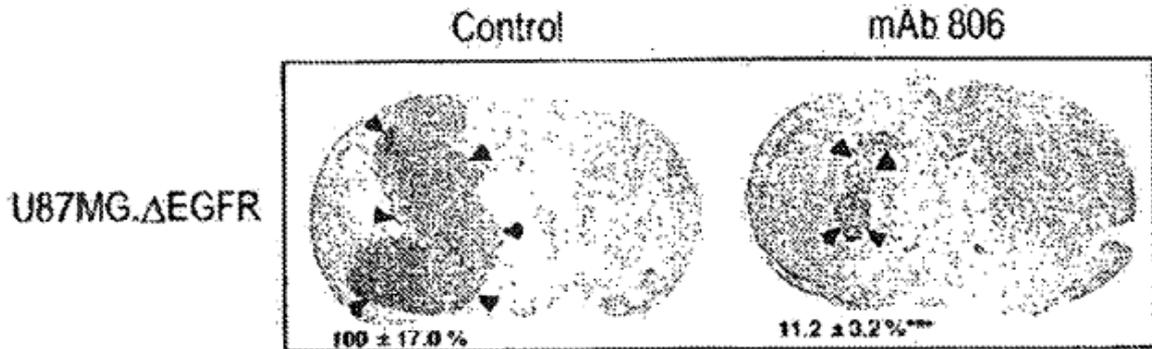


FIG. 24D

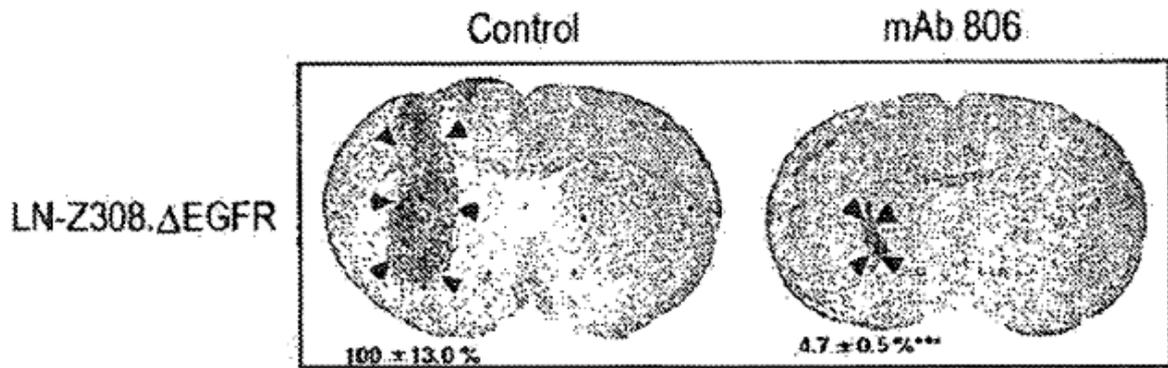


FIG. 25A

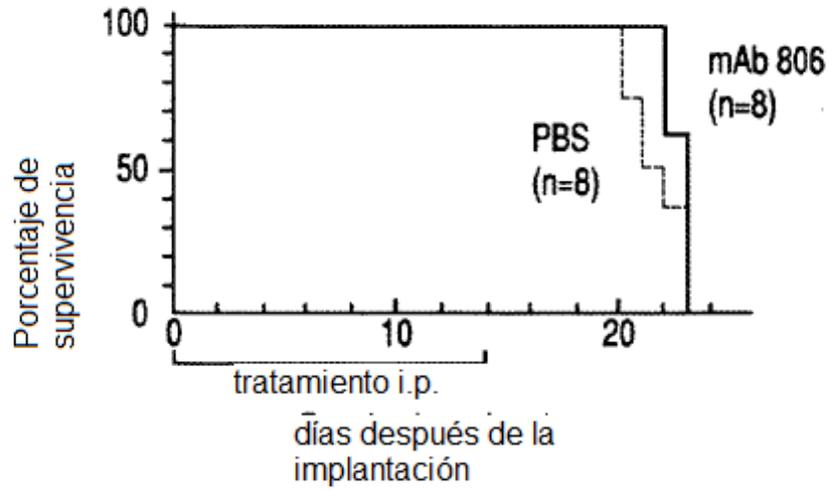


FIG. 25B

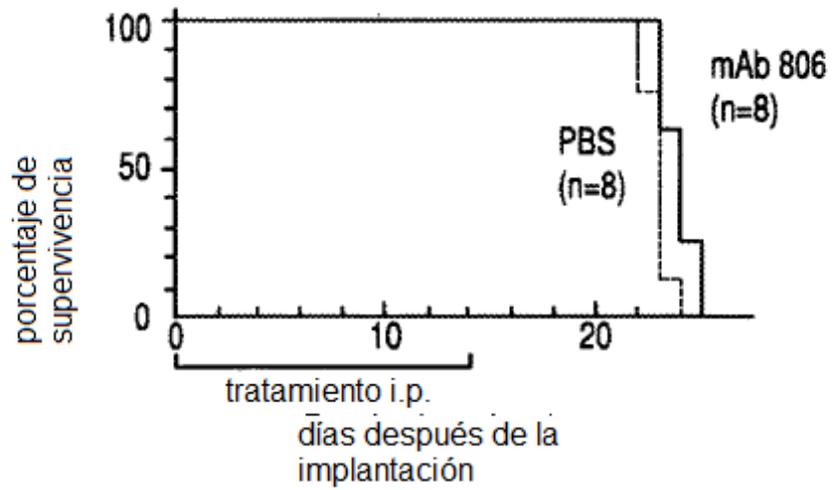
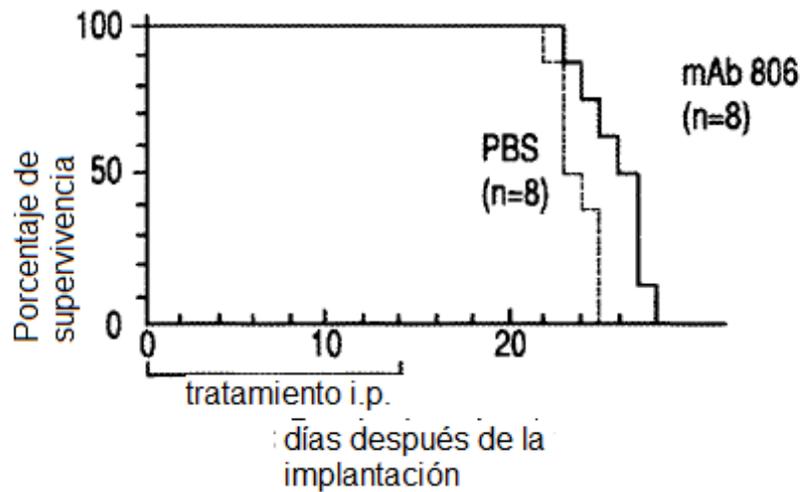


FIG. 25C



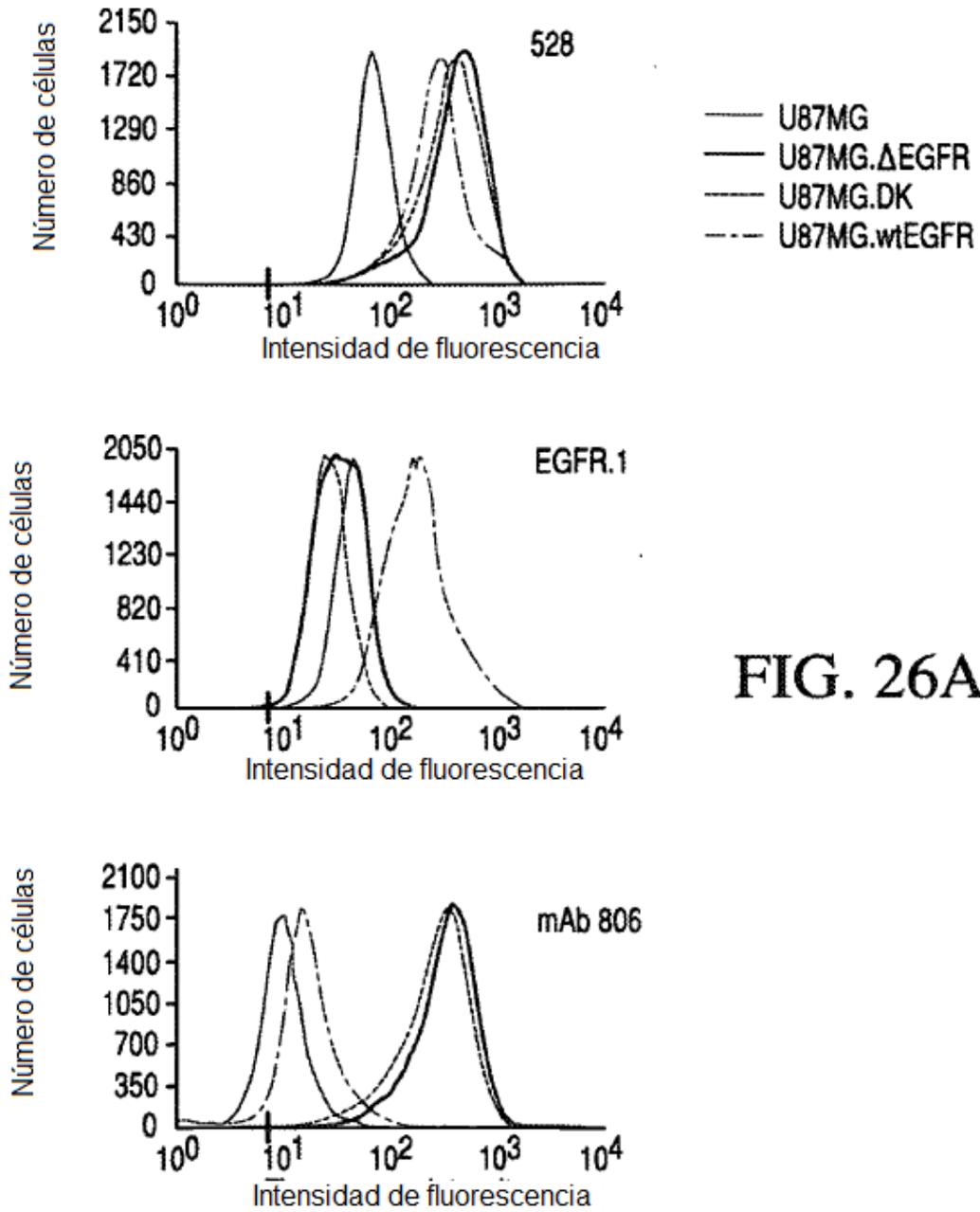


FIG. 26A



FIG. 26B

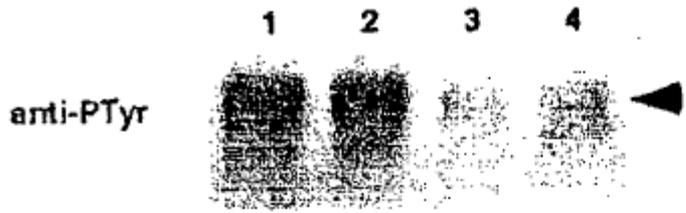


FIG.27A

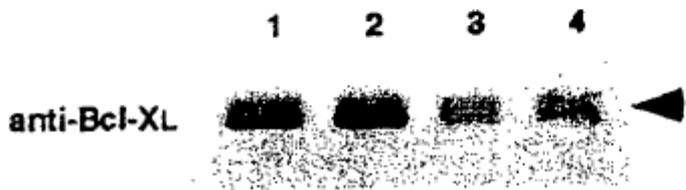


FIG.27B

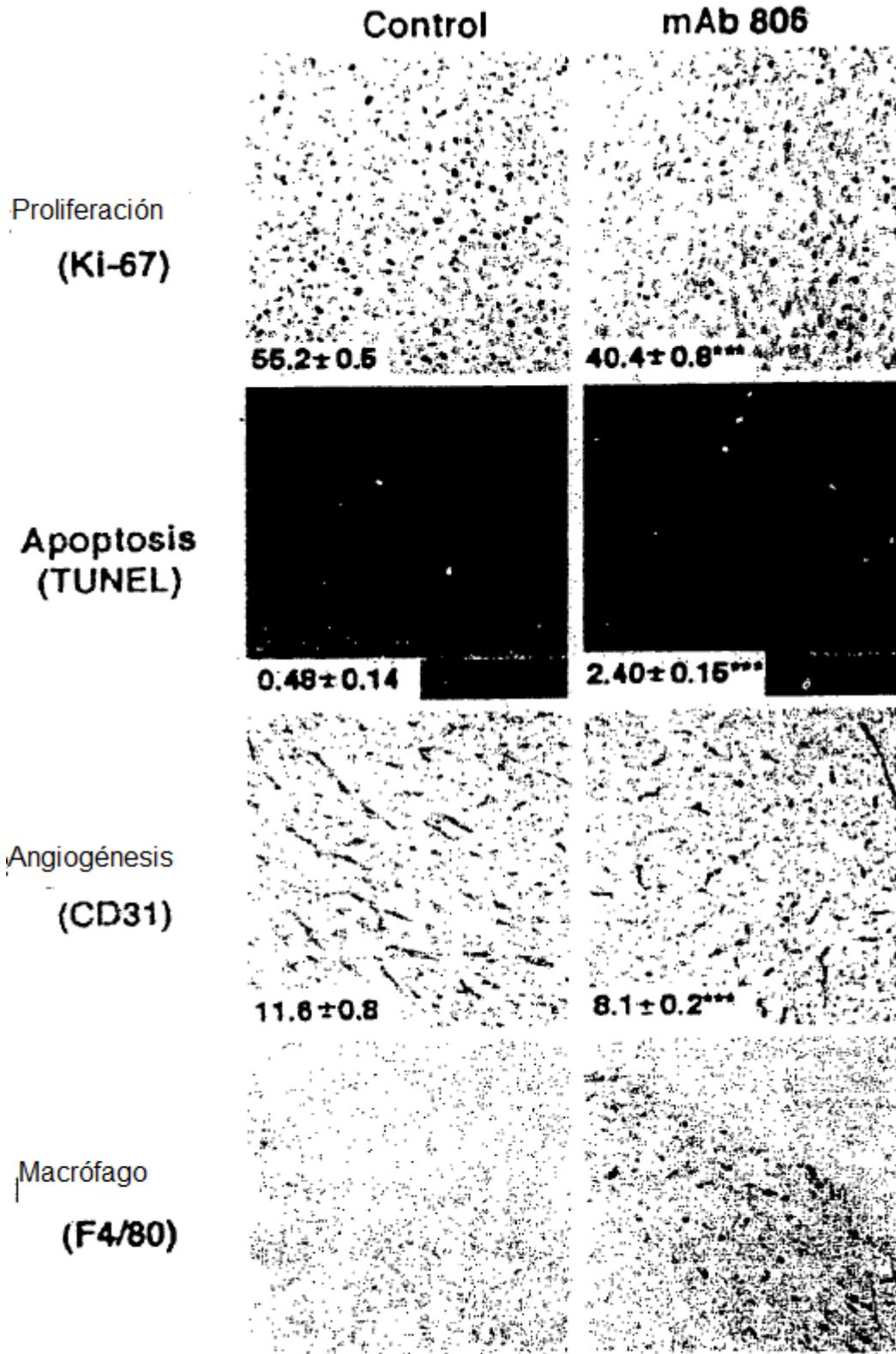


FIG.28

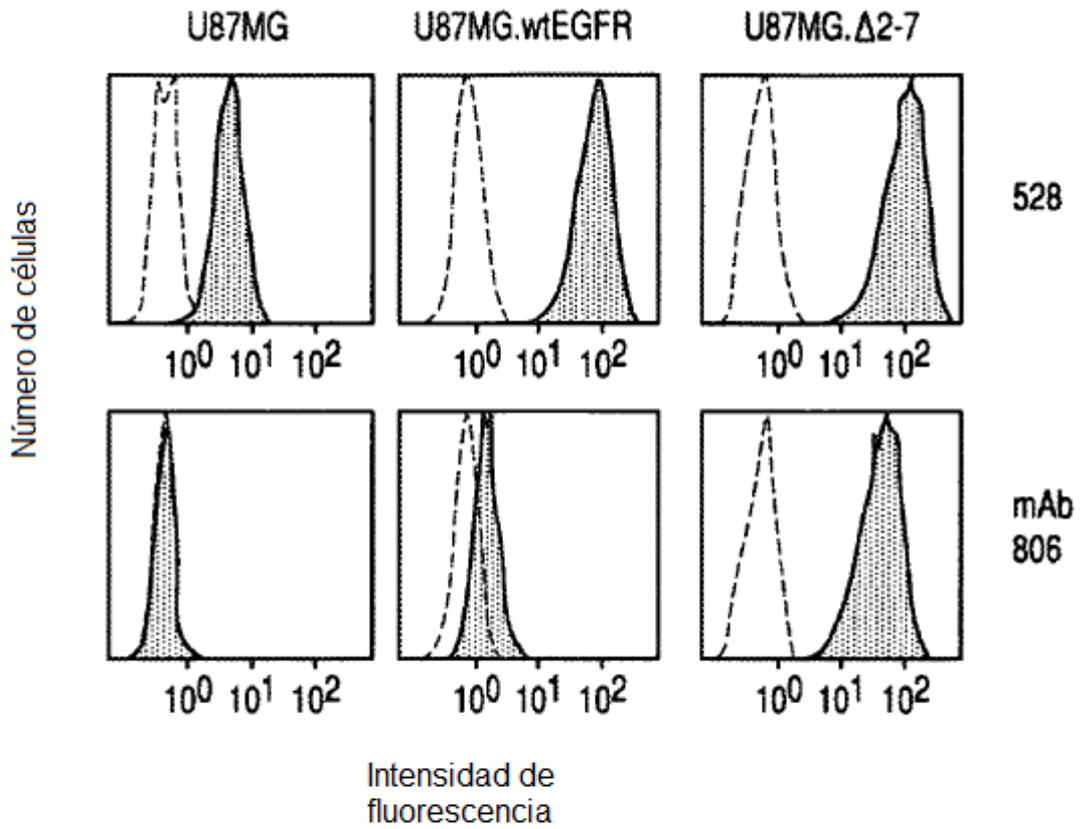


FIG. 29

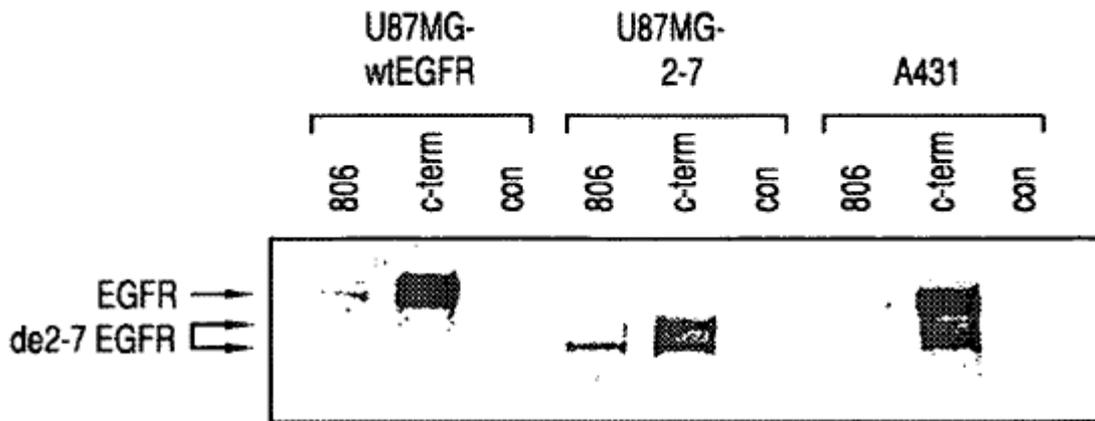


FIG. 30

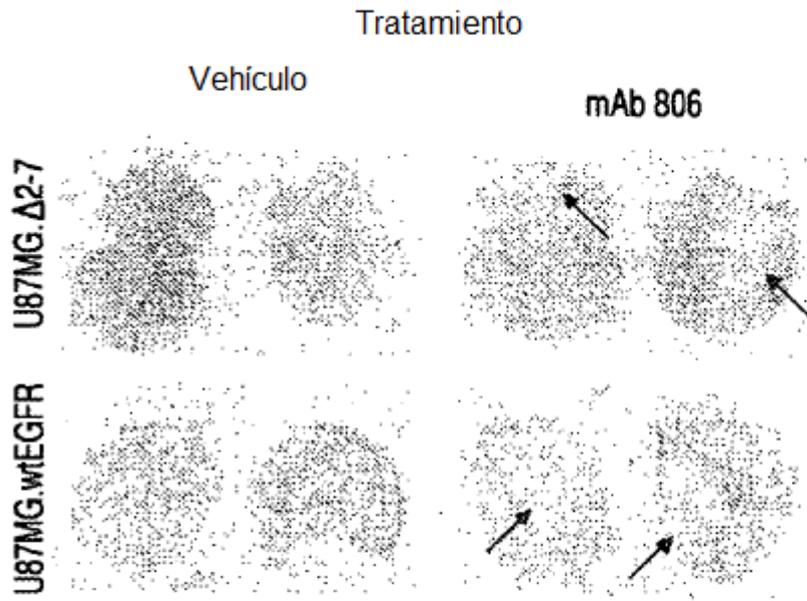


FIG. 31

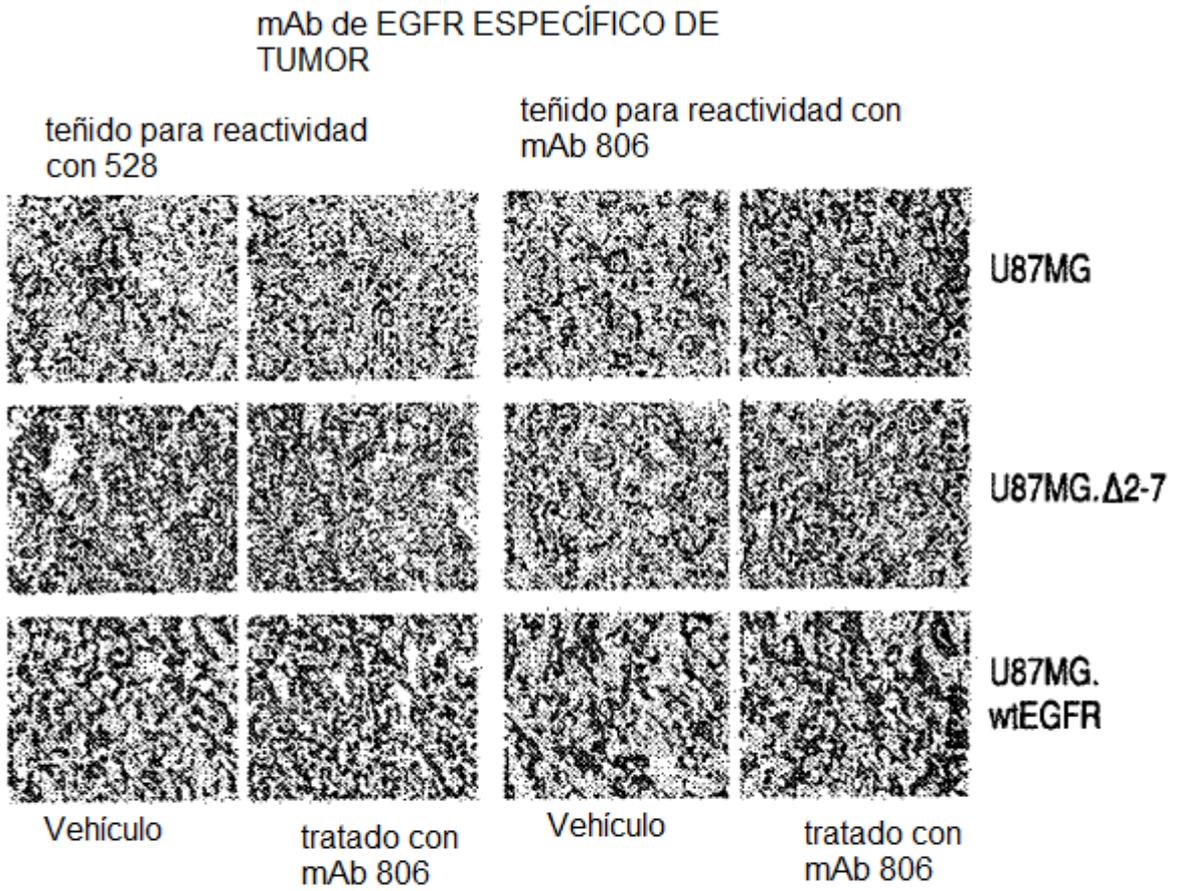


FIG. 32

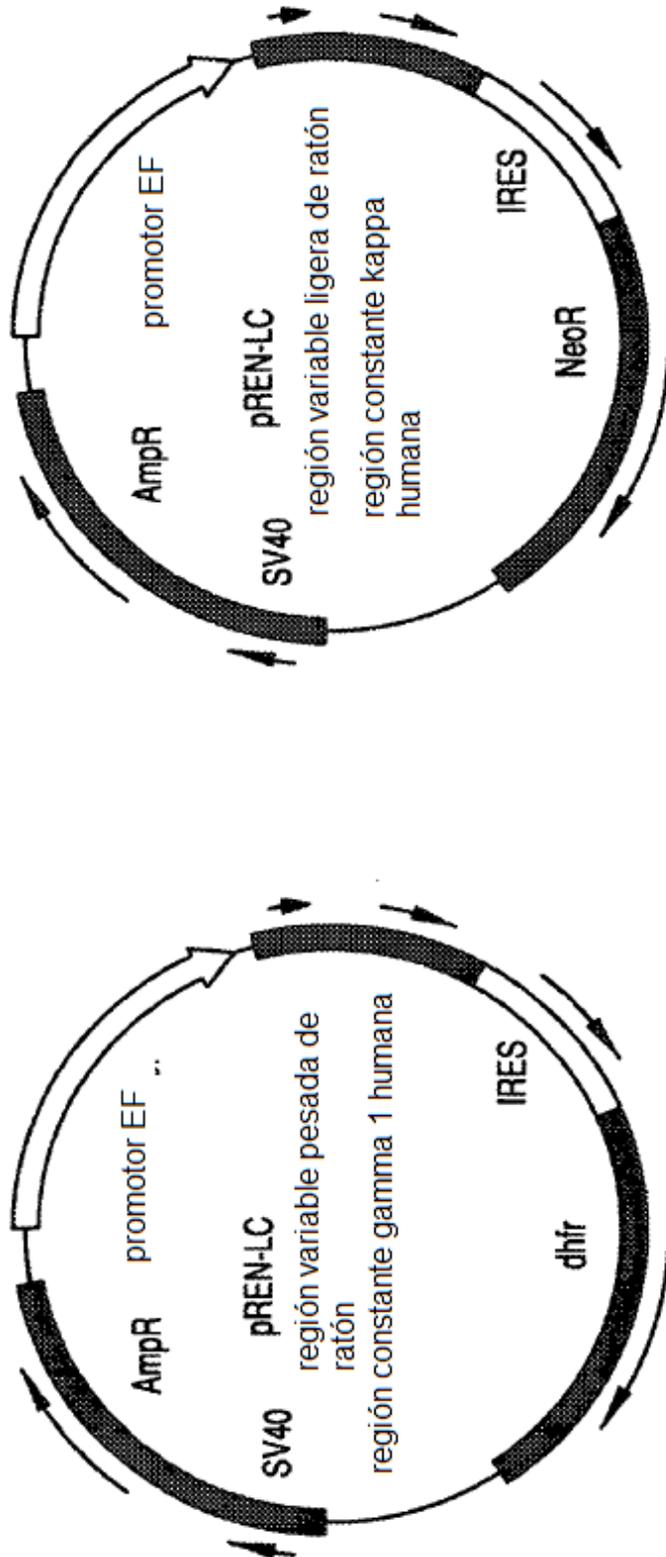


FIG. 33

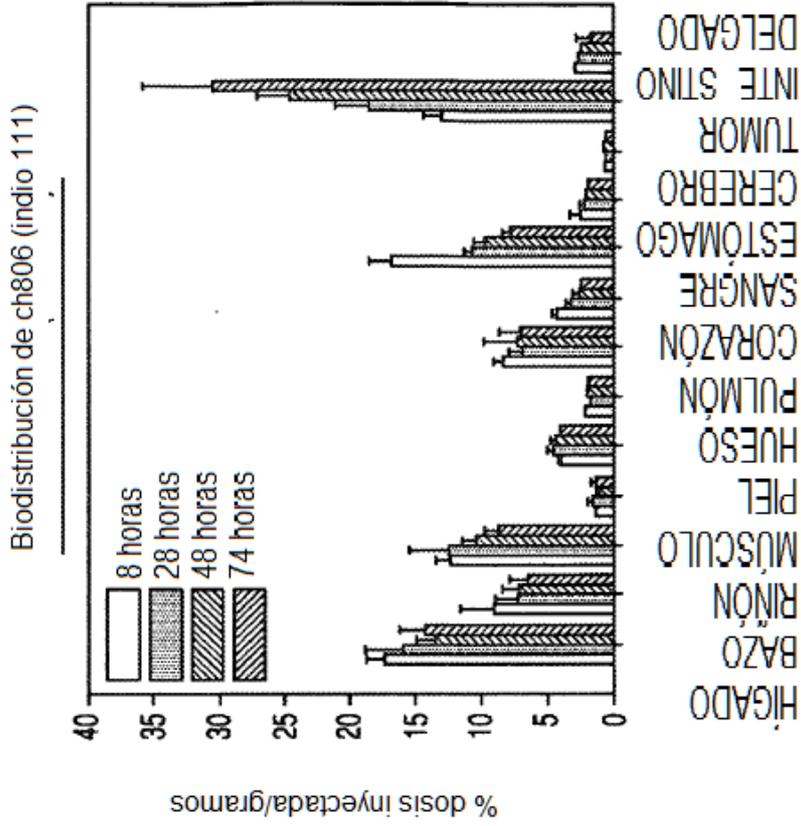


FIG. 34B

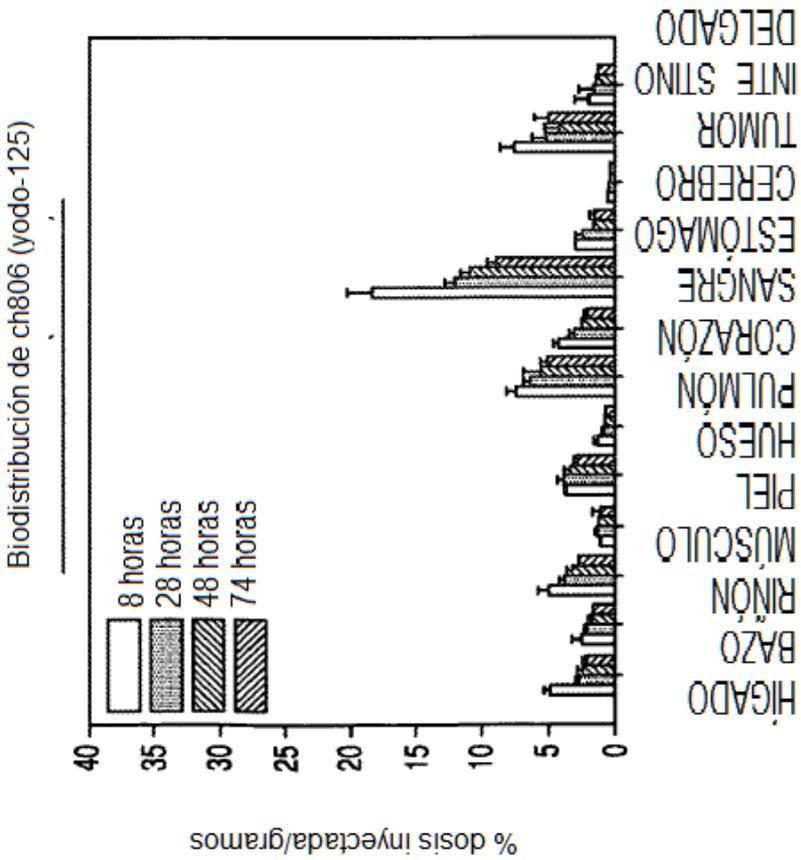


FIG. 34A

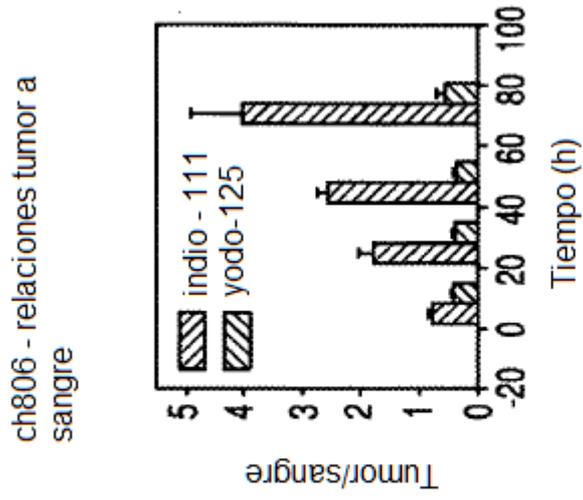


FIG. 35B

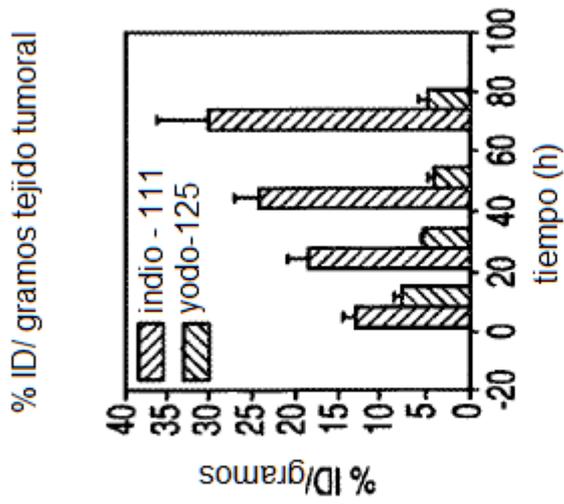
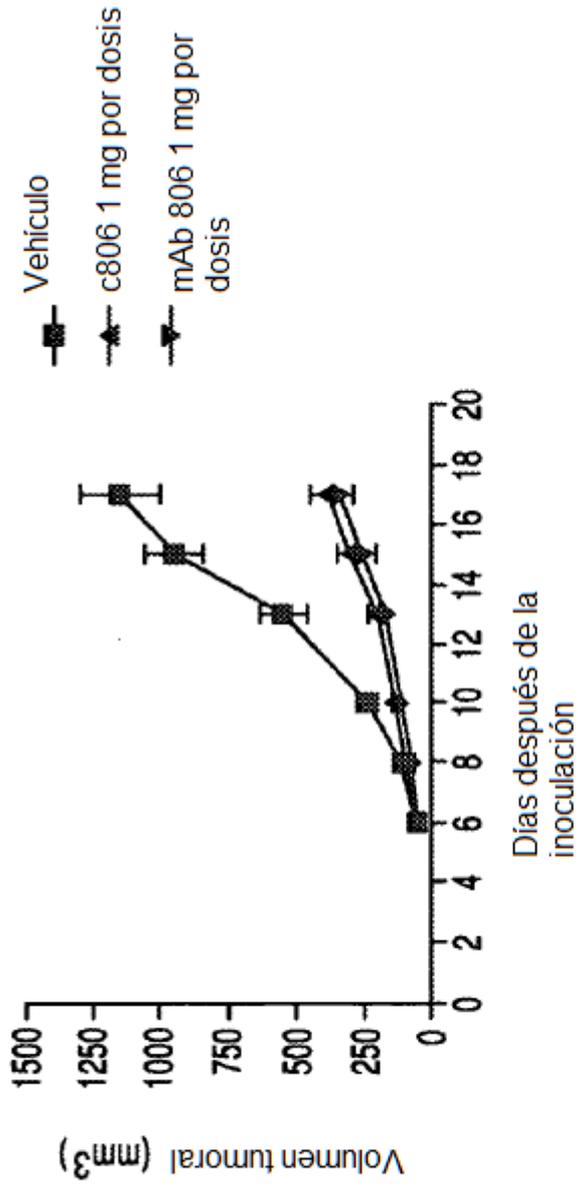


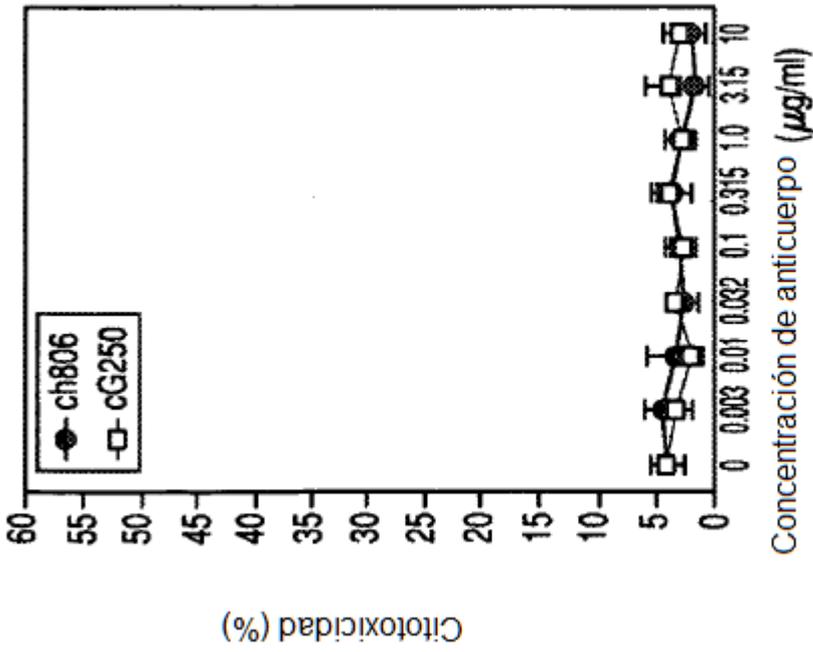
FIG. 35A



Anticuerpo inyectado en los días : 6,8,10,13 & 15

FIG. 36

Actividad CDC de ch806 en células U87MG.de2-7 diana



Actividad CDC de ch806 en células 431 diana

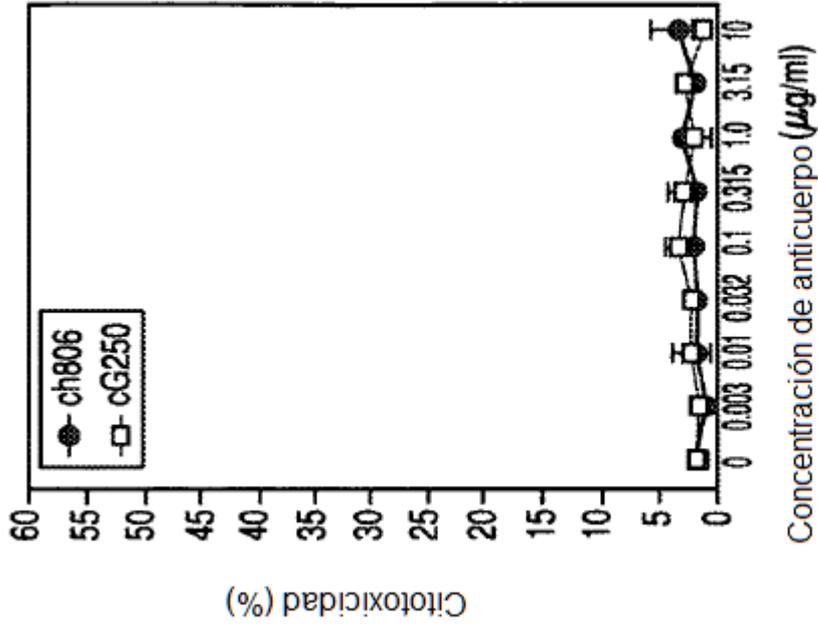


FIG. 37

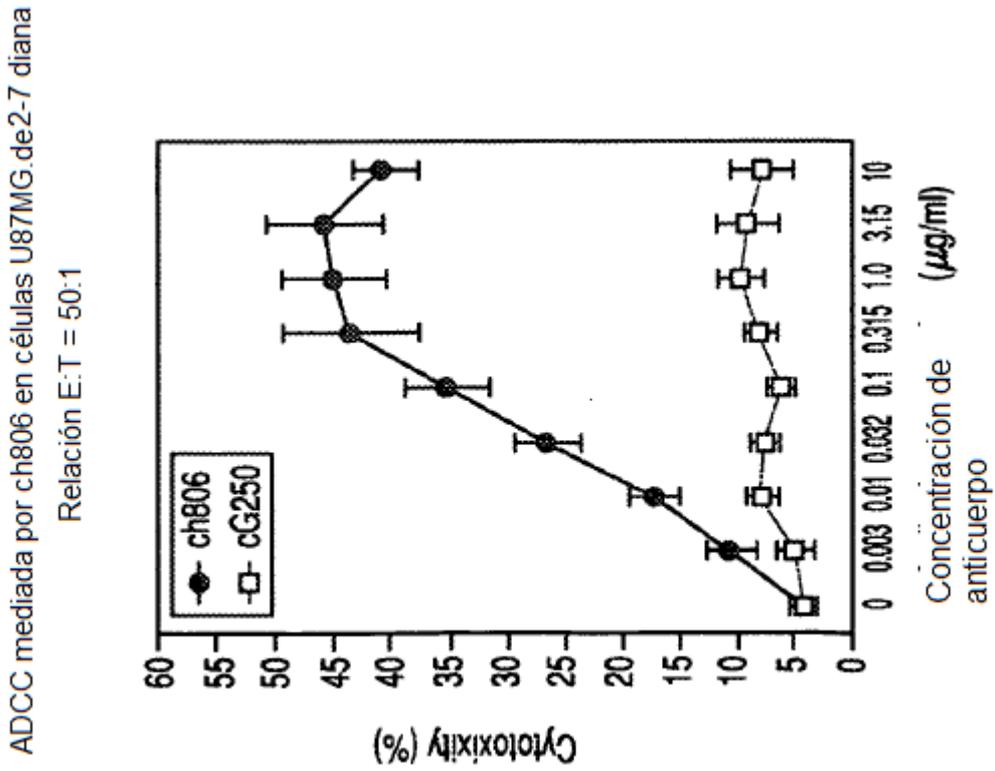
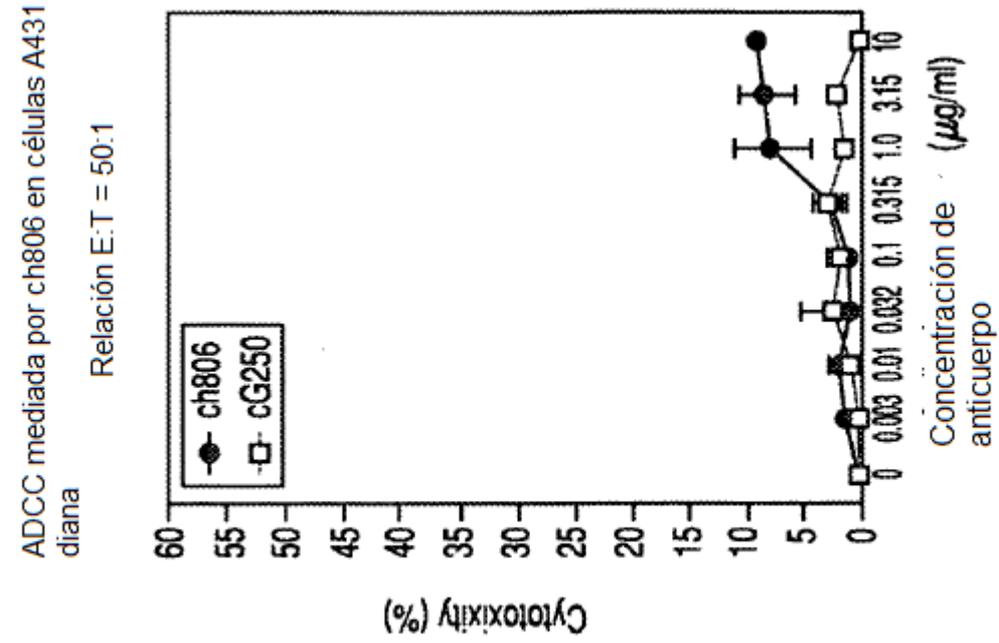


FIG. 38

ADCC mediada por 1ug/ml de ch806 en células U87MG.de2.7 con diferentes relaciones E:T

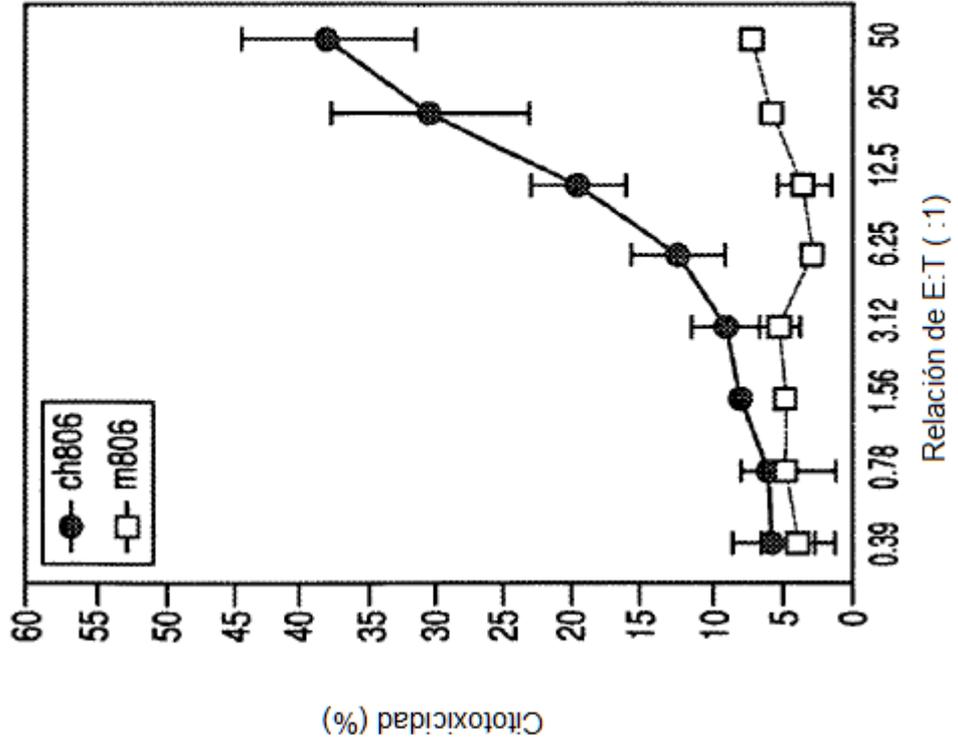


FIG. 39

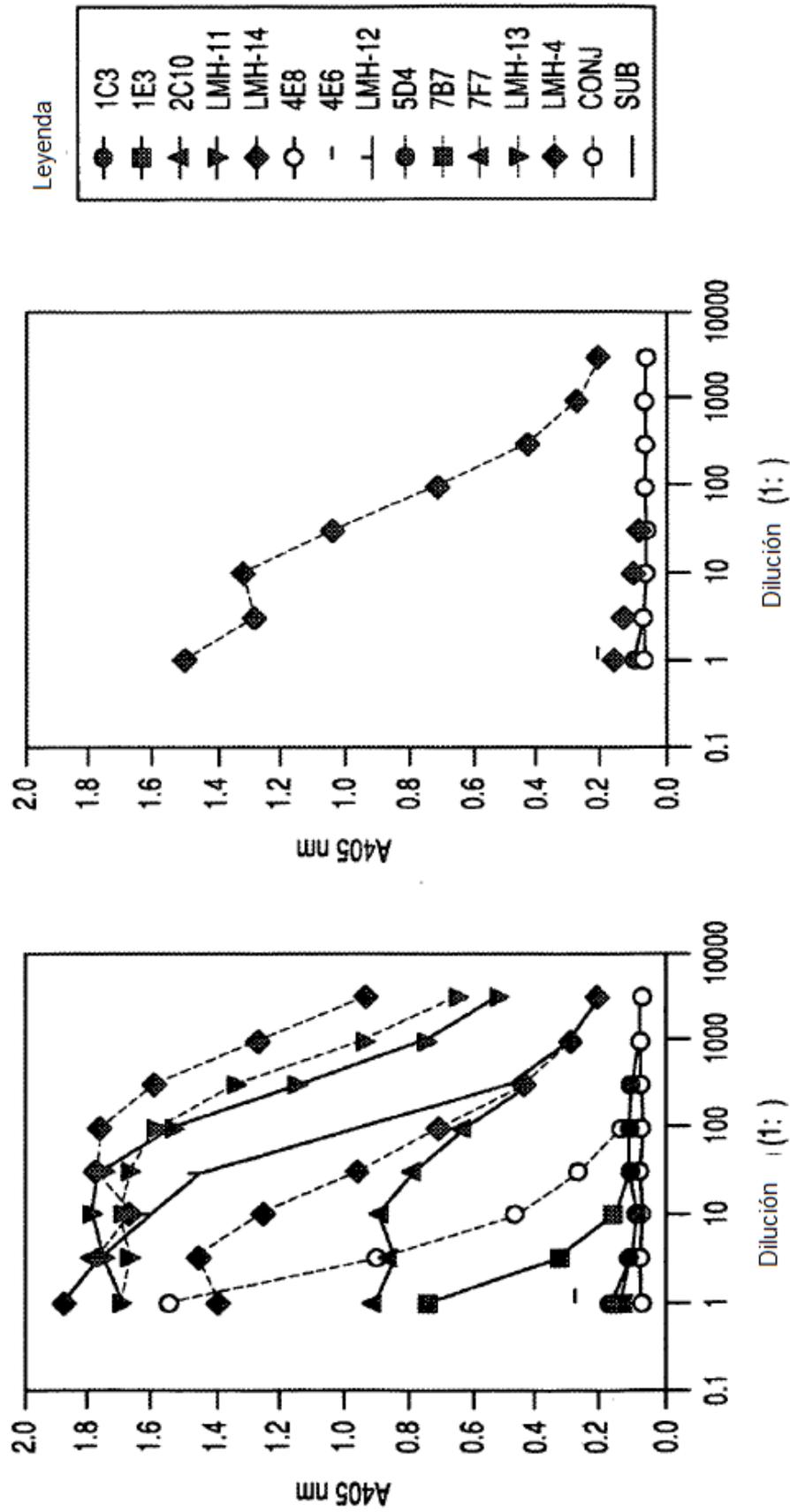


FIG. 40

FIG. 41B

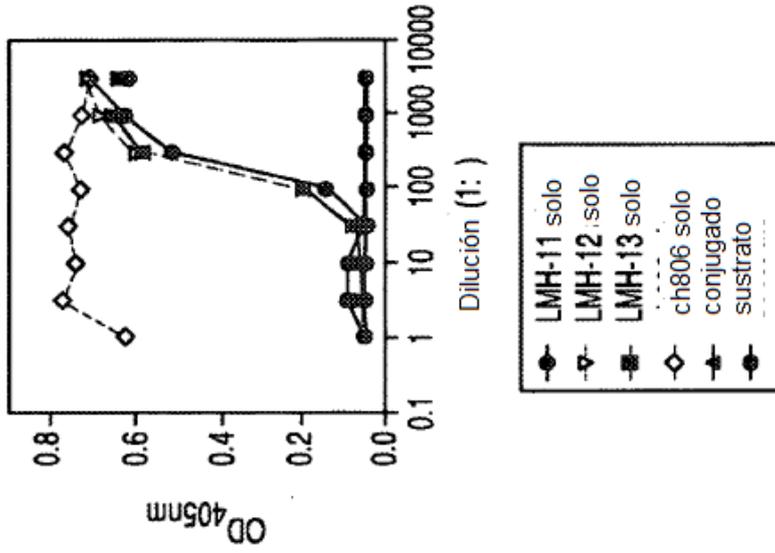


FIG. 41A

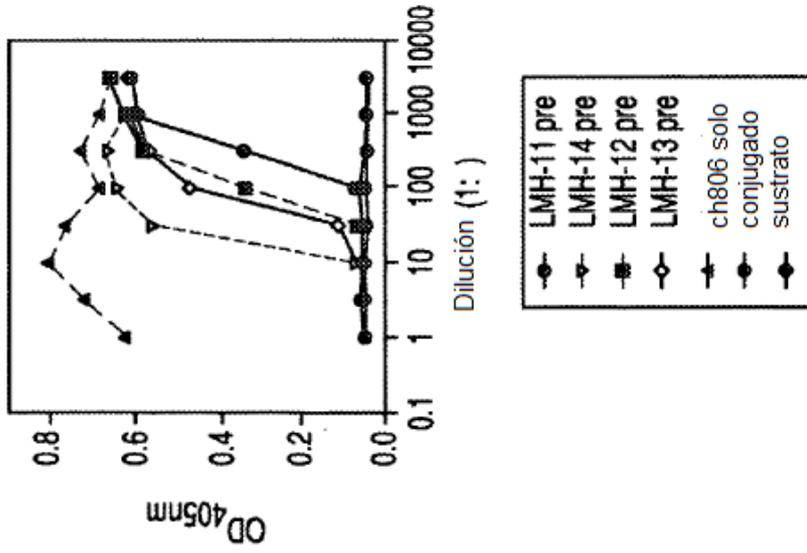


FIG. 41C

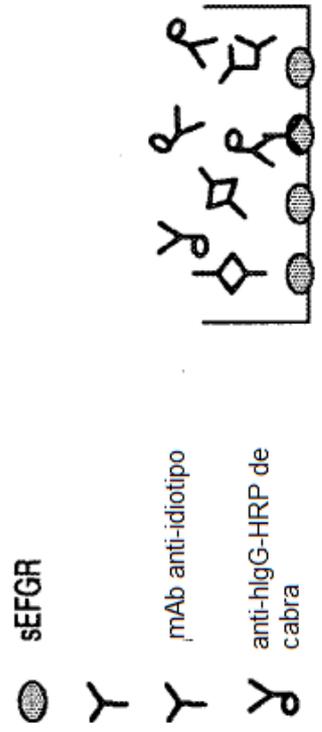


FIG. 42A

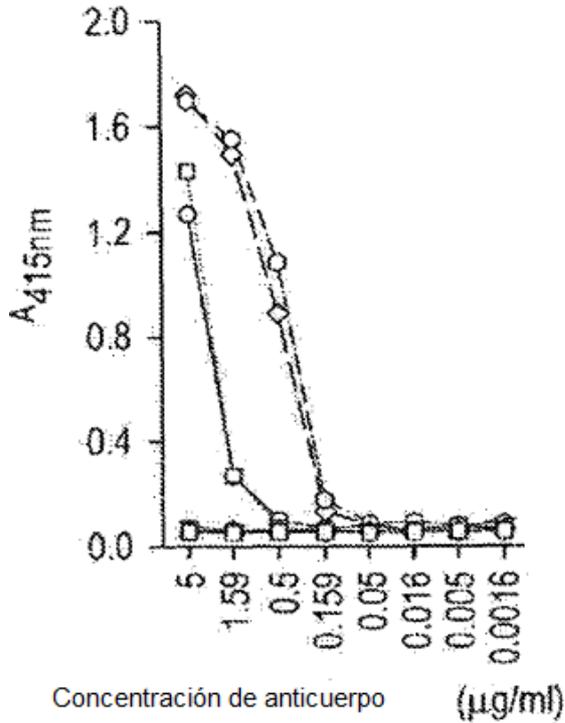
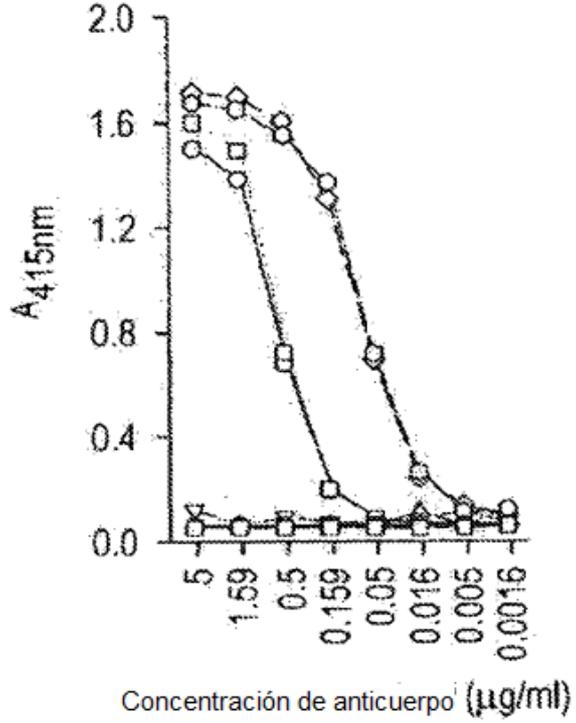


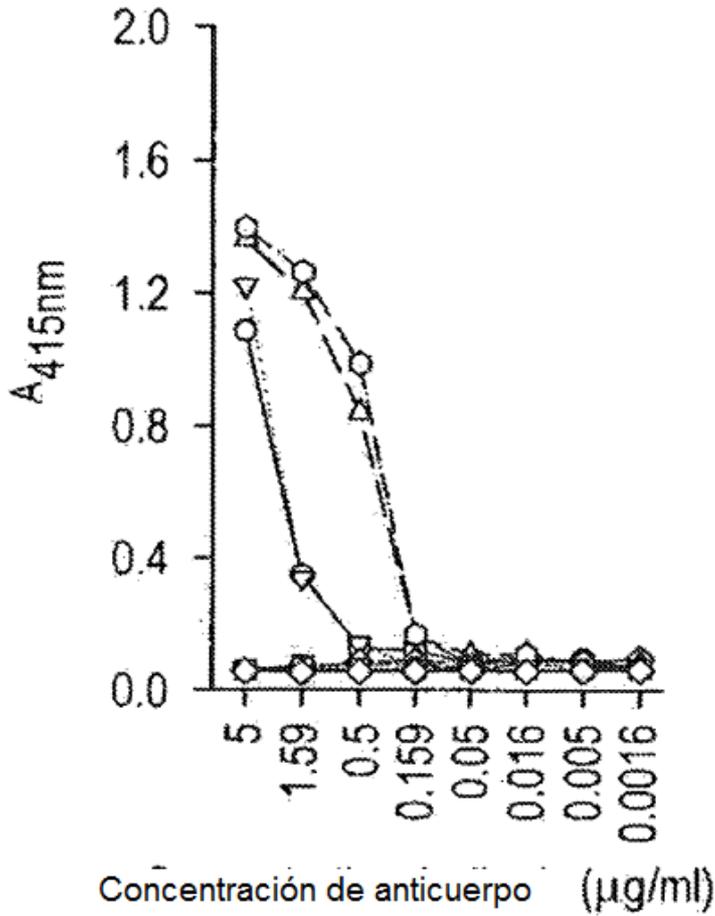
FIG. 42B



- ch806-Suero
- ch806-1%FCS/IMedio
- △ h3S193-Suero
- ▽ h3S193-1%FCS/IMedio M
- ◇ m806-Suero
- m806-1%FCS/IMedio
- m3S193-Suero
- ⊥ m3S193-1%FCS/IMedio M
- Avidina-HRP
- Sustrato ABTS

- ch806-Suero
- ch806-1%FCS/IMedio
- △ h3S193-Suero
- ▽ h3S193-1%FCS/IMedio M
- ◇ m806-Suero
- m806-1%FCS/IMedio
- m3S193-Suero
- ⊥ m3S193-1%FCS/IMedio M
- Avidina-HRP
- Sustrato ABTS

FIG. 42C



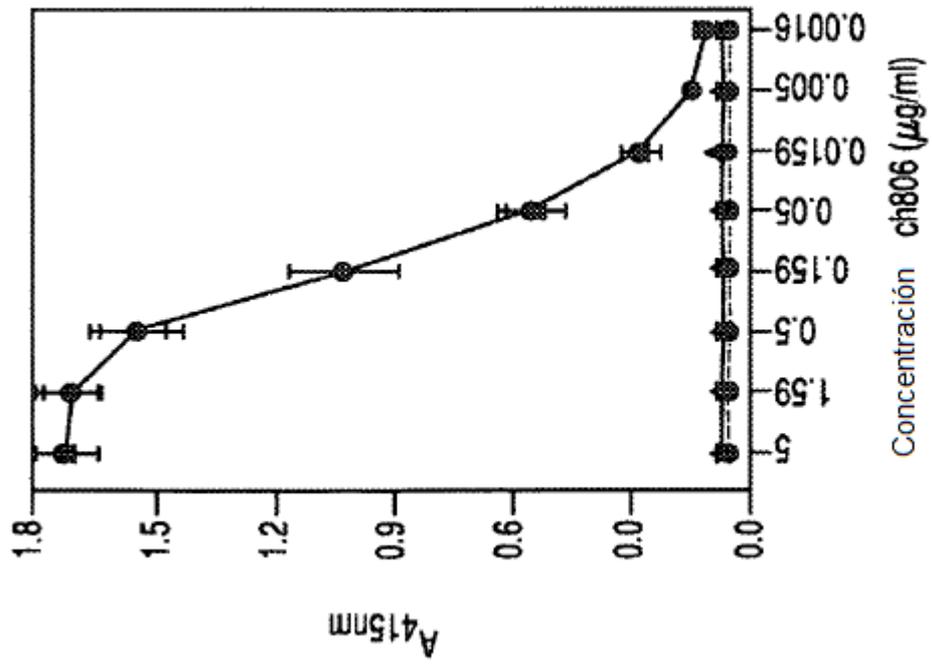


FIG. 43



FIG. 44

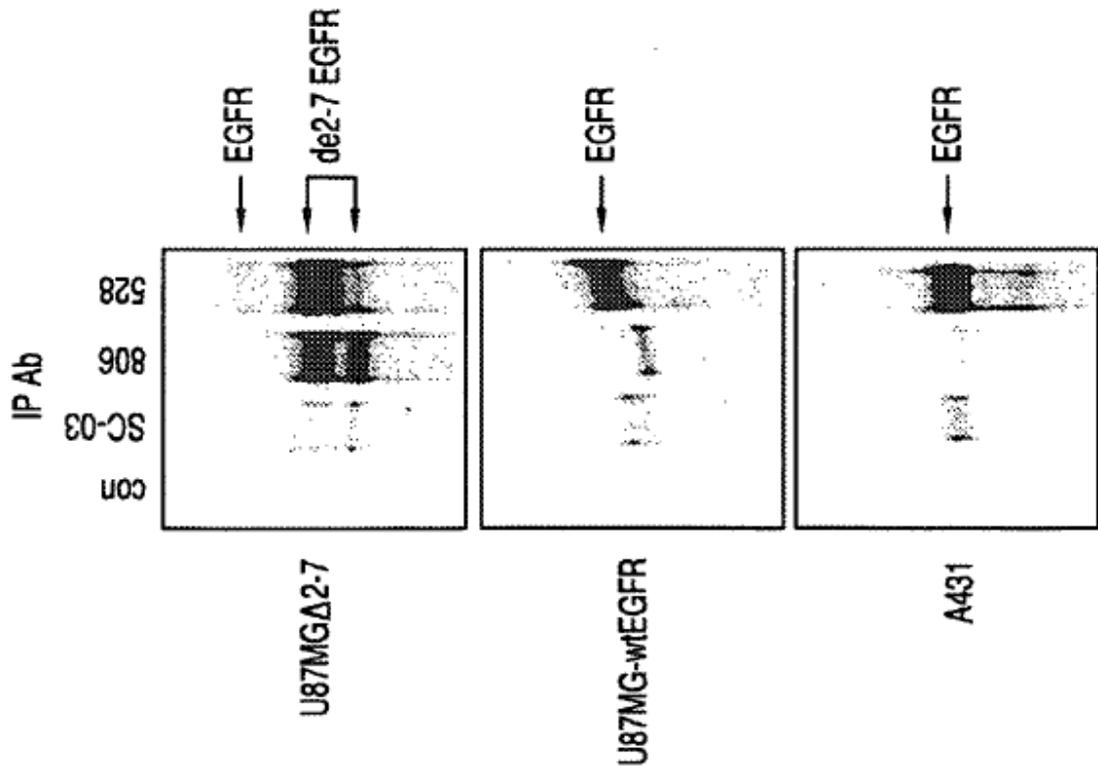


FIG. 45

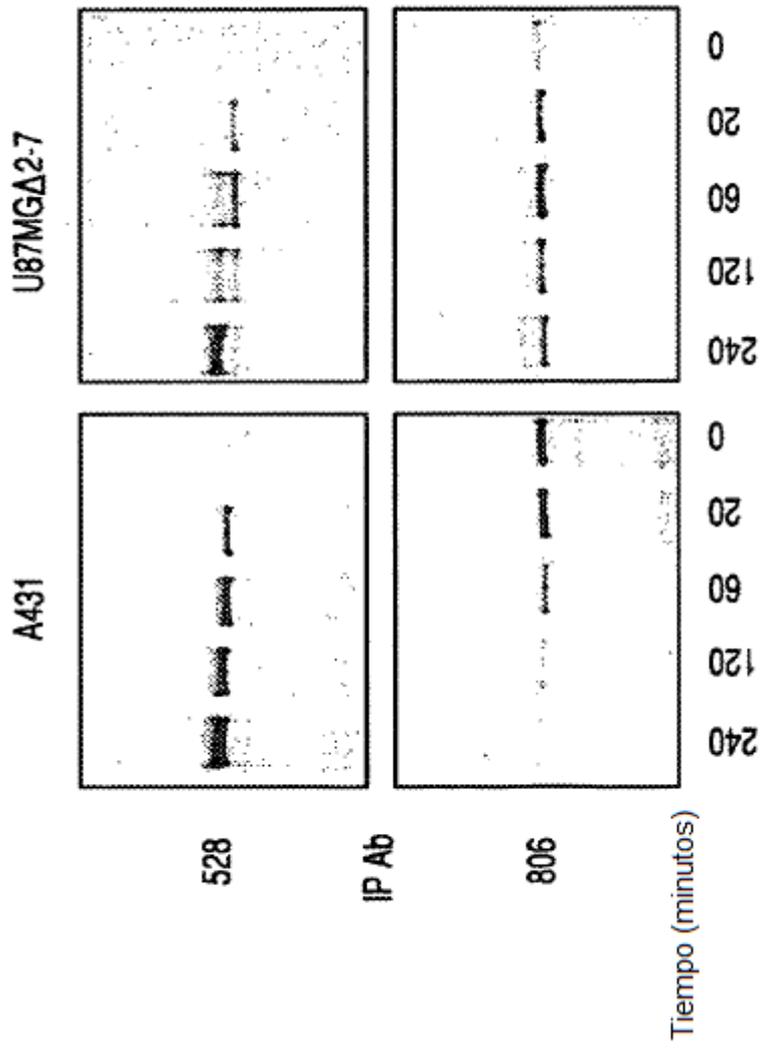


FIG. 46

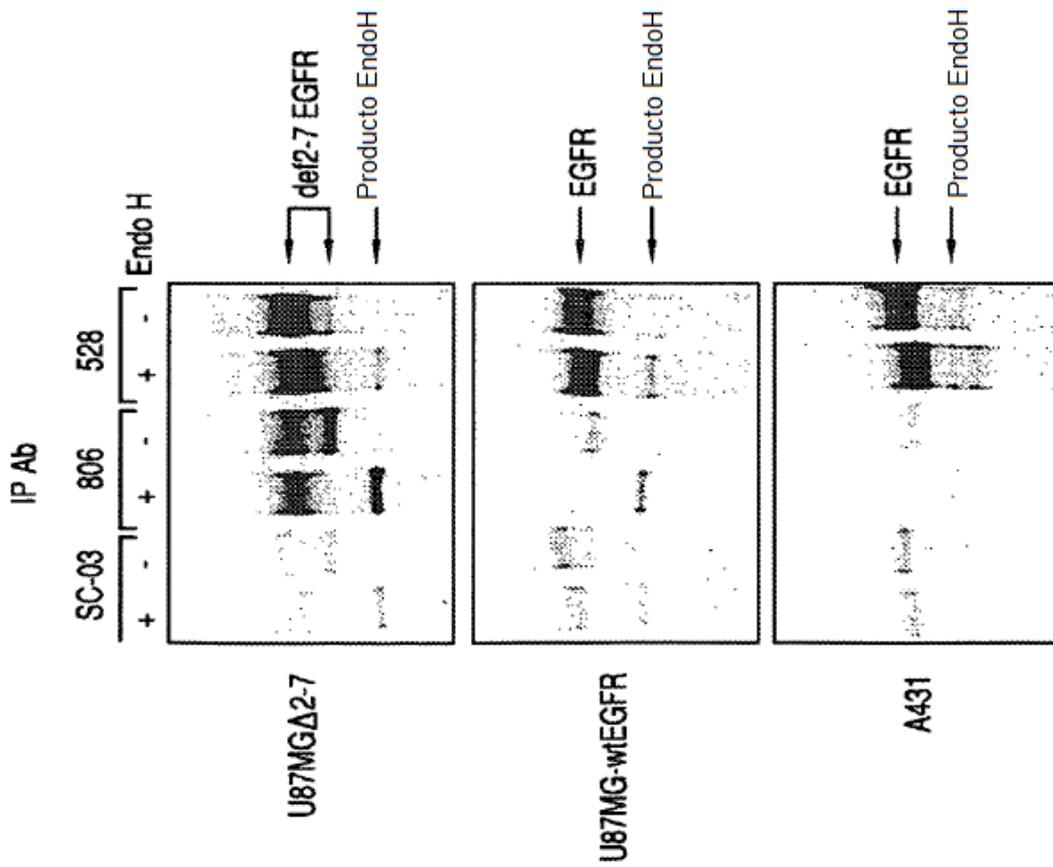


FIG. 47

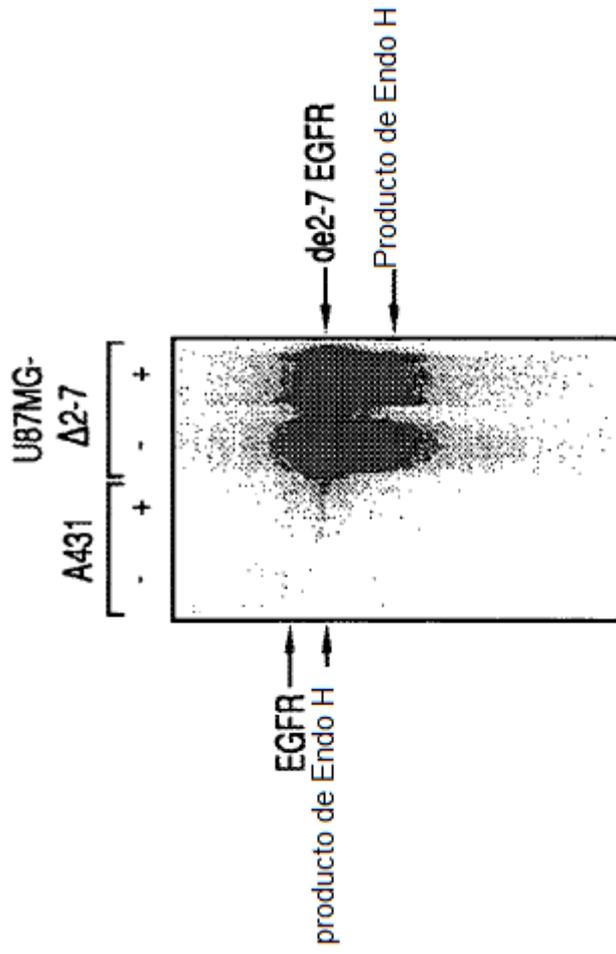


FIG. 48

ES 2 540 802 T3

SEQ ID NO:7 pREN ch806 LC Neo Vector

Xho I
1 CTCGAGAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTC
51 ATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTCCCGGCTCGTATGTTGTGT
EcoRI EF1α promoter
101 GGAGATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGAATTCGTGAGGCTCCGGT
151 GCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGG
201 GGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAA
251 ACTGGGAAAGTGATGTEGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGG
301 GGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAA
351 CGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGFTCCCGCGGGC
401 CTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCCTGCTTGAATTACTTCCACG
451 CCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTG
501 GGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCT
551 TGAGTTGAGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTG
601 GCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAA
651 ATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTA
701 AATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCCGTTTTTGGGGCCGCGGG
751 CGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACATGTTCCGGCGAGGCGGGGCC
801 TGCAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGG
851 CCTGCTCTGGTGCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGC
901 GGCAAGGCTGGCCCGGTCCGGCACCAGTTGCGTGAGCGAAAGATGGCCGC
951 TTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGA
1001 GAGCGGGCGGGTGAGTCACCACACAAAGGAAAAGGGCCTTCCGTCTCTC

FIG.49

S V V C L L N N F Y P R E A K V Q

1976 AGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTC
W K V D N A L Q S G N S Q E S V

2026 ACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGAC
T E Q D S K D S T Y S L S S T L T

2076 GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCA
L S K A D Y E K H K V Y A C E V T

2126 CCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG
H Q G L S S P V T K S F N R G E
Nhe/Xba

2176 TGTTGAGCTAGAACTAACTAAGCTAGCAACGGTTTCCCTCTAGCGG
C *

2226 GATCAATTCCGCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGAA

2276 TAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTCCACCATATTGCCGTC

2326 TTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCA

2376 TTCCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAAT

2426 GTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTC

2476 TGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCC

2526 TCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAA

2576 CCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCT

2626 CTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTACCCC

2676 ATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACGTGTGTT

2751 TAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTT

2801 TTCCTTTGAAAAACACGATAATACCATGGTTGAACAAGATGGATTGCACG

2851 CAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCA

2901 CAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCA

2951 GGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATG

FIG.49 (continuación)

3001 AACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTT
 3051 CCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCT
 3101 GCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTC
 3151 CTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACG
 3201 CTTGATCCGGCTACCTGCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGA
 3251 GCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGG
 3301 ACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTTCGCCAGGCTCAAG
 3351 GCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGACCCATGGCGATGCCTG
 3401 CTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACT
 3451 GTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACC
 3501 CGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGT
 3551 GCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCC
 3601 TTCTTGACGAGTTCTTCTGAGTCGATCGACCTGGCGTAATAGCGAAGAGG
 3651 CCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGG
 3701 GACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCG
 3751 CAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTT
 3801 TCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTGCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTA
 3851 AATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGA
 3901 CCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCT
 3951 GATAGACGGTTTTTCGCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTG
 4001 GACTCTTGTTCCAAACTGGAAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTTA
 4051 TAAGGGATTTTGCCGATTTCCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTA
 4101 ACAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGCTTACAATTTAGGT
 4151 GGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATATTTGTTTATTTTTTC

FIG.49 (continuación)

4201 TAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAAT
 4251 GCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTG
 4301 TCGCCCTTATTCCCTTTTTTGC GGCATTTTGCCTTACTGTTTTTGCTCAC
 4351 CCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACG
 4401 AGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTT
 4451 TTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTA
 4501 TGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTG
 4551 CCGCATACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAG
 4601 AAAAGCATATTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCC
 4651 ATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGG
 4701 AGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAA
 4751 CTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGAC
 4801 GAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAA
 4851 ATTA
 4901 GGATGGAGGCGGATAAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCG
 4951 GCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCG
 5001 CGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAG
 5051 TTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAG
 5101 ATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCA
 5151 AGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTA
 5201 AAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCT
 5251 TAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAA
 5301 AGGATGTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCACGTAATCTGCTGCTTGCAAA

FIG.49 (continuación)

5351 CAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGGATCAAGAGCTAC
5401 CAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAAT
5451 ACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGT
5501 AGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTG
5551 CCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTA
5601 CCGGATAAGGCGCAGCGGTCTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCC
5651 CAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGC
5701 TATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCG
5751 GTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGG
5801 AAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCTGGGTTTCGCCACCTCTGACTTG
5851 AGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAC
5901 GCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCFTTTGCTGGCCTTTTGC
5951 TCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTA
6001 CCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGC
6051 AGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCC
6101 TCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGGTATCACGAGGCCCTTT
6151 CGTCTTCAC

FIG.49 (continuación)

1901 AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG
 A A L G C L V K D Y F P E P V T V

1951 TGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCT
 s w n s g a l t s g v h t f p a

2001 GTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCC
 v l q s s g l y s l s s v y s v p

2051 CTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC
 S S S L G T Q T Y I C N V N H K P

2101 CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA
 S N T K V D K K V E P K S C D K

2151 ACTCACACATGCCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTC
 T H T C P P C P A P E L L G G P S

2201 AGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGA
 V F L F P P K P K D T L M I S R T

2251 CCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAG
 P E V T C V V V D V S H E D P E

2301 GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAACGCCAAGAC
 V K F N W Y V D G V E V H N A K T

2351 AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCC
 K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L

2401 TCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
 T V L H Q D W L N G K E Y K C K

2451 GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGC
 V S N K A L P A P I E K T I S K A

2501 CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG
 K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E

2551 AGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC
 E M T K N Q V S L T C L V K G F

2601 TATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA
 Y P S D I A V E W E S N G Q P E N

2651 CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC

FIG.50 (continuación)

N Y K T T P P V L D S D G S F F L
 2701 TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC
 Y S K L T V D K S R W Q Q G N V
 2751 TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA
 F S C S V M H E A L H N H Y T Q K
 Nhe/Xba
 2801 GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGCTAGAACTAACTAAGCTAGC
 S L S L S P G K *
 2851 AACGGTTCCCTCTAGCGGGATCAATTCCGCCCCCCCCCCTAACGTTAC
 2901 TGGCCGAAGCCGCTTGGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTAT
 2951 TTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGC
 3001 CCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGG
 3051 AATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTT
 3101 CTGGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCC
 3151 CCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATAC
 3201 ACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTG
 3251 TGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAG
 3301 GATGCCCAGAAGGTACCCCATTTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTG
 3351 CACATGCTTTACGTGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAACGTCTAGGCCCCCC
 3401 GAACCACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATAATACCATGGTT
 3451 CGACCATTGAACTGCATCGTCGCCGTGTCCCAAATATGGGGATTGGCAA
 3501 GAACGGAGACCTACCCTGGCCTCCGCTCAGGAACGAGTTCAAGTACTTCC
 3551 AAAGAATGACCACAACCTCTTCAGTGAAGGTAAACAGAATCTGGTGATT
 3601 ATGGGTAGGAAAACCTGGTTCTCCATTCTGAGAAGAATCGACCTTTAAA
 3651 GGACAGAATTAATGGTTTCGATATAGTTCTCAGTAGAGAACTCAAAGAACC
 3701 ACCACGAGGAGCTCATTCTTCCAAAAGTTTGGATGATGCCTTAAGAC
 3751 TTATTGAACAACCGGAATTGGCAAGTAAAGTAGACATGGTTTGGATAGTC

FIG.50 (continuación)

3801 GGAGGCAGTTCTGTTTACCAGGAAGCCATGAATCAACCAGGCCACCTCAG
 3851 ACTCTTTGTGACAAGGATCATGCAGGAATTTGAAAGTGACACGTTTTTCC
 3901 CAGAAATTGATTTGGGGAAATATAAACTTCTCCCAGAATACCCAGGCGTC
 3951 CTCTCTGAGGTCCAGGAGGAAAAAGGCATCAAGTATAAGTTTGAAGTCTA
 4001 CGAGAAGAAAGACTAACAGGAAGATGCTTTCAAGTTCTCTGCTCCCCTCC
 Extremo romo
 Sali/Sali
 4051 TAAAGCTATGCATTTTTATAAGACCATGGGACTTTTGCTGGTCGATCGAC
 4101 CTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGC
 4151 GCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCG
 4201 GCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCT
 4251 AGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTGCGCCG
 4301 GCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTT
 4351 AGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTC
 4401 ACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCTTTGACGTTGGA
 4451 GTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCA
 4501 ACCCTATCTCGGTCTATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTGCGCCTATTGG
 4551 TTA AAAAATGAGCTGATTTAACAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATA
 4601 TTAACGCTTACAATTTAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACC
 4651 CCTATATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATG
 4701 AGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTAT
 4751 GAGTATCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTT
 4801 GCCTTACTGTTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCT
 4851 GAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAG
 4901 CGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGA

FIG.50 (continuación)

4951 GCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCC
 5001 GGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGT
 5051 TGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATATTACGGATGGCATGACAGTAA
 5101 GAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAAC
 5151 TTA CT TCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCA
 5201 CAACATGGGGGATCATGTA ACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGA
 5251 ATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATG
 5301 GCAACAACGTTGCGCAA ACTATTA ACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTC
 5351 CCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAAGTTGCAGGACCAC
 5401 TTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGA
 5451 GCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGG
 5501 TAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTA
 5551 TGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAG
 5601 CATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTT
 5651 AAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATA
 5701 ATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCA
 5751 GACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATGTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCA
 5801 CGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTG
 5851 TTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTA ACTGGCTTCA
 5901 GCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGC
 5951 CACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAAT
 6001 CCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGGT
 6051 TGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGGCTGAACG

FIG.50 (continuación)

6101 GGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACT
6151 GAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGA
6201 GAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGAACAGGAGAGCGC
6251 ACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCCTTATAGTCCTGTCCG
6301 GTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGG
6351 GCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTACGGTTCCTG
6401 GCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGA
6451 TTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCC
6501 GCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAG
6551 CGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATG
6601 CAGGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAC

FIG.50 (continuación)

Cadena VH de mAb124: secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos

A. Secuencia de ácidos nucleicos

GATGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGACCTAGCCTGGTGAACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTCACCTGCACCTGTCACTGGCT
 ACTCAATCACCAGTGACTATGCCTGGAAGTCCAGGAGTTCAGGAAACAACACTGGAGTGGATGGGCTACATAA
 GTTACAGTGCTAACACTAGGTACAACCCATCTCTCAAAGTCGAACTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAACCAATT
 CTTCCCTGCAGTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATAATTACTGTGCAACGGCGGGACGCGGGTTTCCTTAC
 TGGGGCCAAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (SEQ ID NO:21)

B. Secuencia de aminoácidos

DVQLQESGPSLVKPSQSLSTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSANTRYNPSLKSRSISITRDTSKNQFFLQL
CDR1
 NSVTTETATYYCATAGRGPYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:22)
CDR3

FIG.51

Cadena VL de mAb124: secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos

C. Secuencia de ácidos nucleicos

GACATCCTGATGACCCAAATCTCCAATCCTCCATGCTCTCTATCTCTGGGAGACACAGTCAGTATCAGTCTTGGCCATTCAAGTCA
 GGACATTAAACAGTAATATAGGGTGGTTGCAGCAGAAACCAGGAAATCATTTAAGGGCCTGATCTATCATGGAAACCAA
 CTTGGACGATGGAGTTCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGAGCCGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTGGAA
 TCTGAAGATTTGTAGACTATTACTGTGTACAGTATGGTCAGTTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCCAACCAAGCTGGAAA
 TCAAACGG (SEQ ID NO:26)

D. Secuencia de aminoácidos

DILMTQSPSSMSLSLGDTVSITCHSSQDINSNIGWLQKPKGKFKGLIYHGTNLDGVPSRFSGSGGADYSLTISSLESEDFVD
 CDR1
 YYCVQYGOFPWTFGGGKLEIKR (SEQ ID NO:27)
 CDR3

FIG.51 (continuación)

Cadena VH de mAb1133 : secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos

A. Secuencia de ácidos nucleicos

GATGTGCAGCTTCAGGGGTCGGGACCTAGCCTGGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTCACCTGCACTGTCACTGGCT
 ACTCAATCACCCAGTGATTATGCCCTGGAAGCTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAACCTGGAGTGGATGGGCTACATAA
 GCTACAGTGGTAACACTAGATACAACCCATCTCTCAGAGTCCGAACTCTATCACTCGAGACACATCCAAAGAACCAATT
 CTTCTGCAGTTGAAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATAATTACTGTGCAACGGGGACGGGATTTCCCTTAC
 TGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTGCA (SEQ ID NO:31)

B. Secuencia de aminoácidos

DVQLQGSPSLVKPSQSLTCTVTGYSITSDYAWNWRQFPGNKLEWMGYISYSGNTRYNPSLRSRISITRDTSKNQFFLQL
 CDR1
 NSVTTEDTATYYCATAGRGFPYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:32)
 CDR3

CDR2

FIG.52

Cadena VL de mAb1133: secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos

C. Secuencia de ácidos nucleicos

GACATCCTGATGACCCAATCTCCATCCTCCATGTCTGTCTCTGGGAGACACAGTCAACATCACTTGCCATTCAAAGTC
 AGGACATT AACAGTAAATAGGGTGGTTGCAGCAGAACCAGGGAATCATTTAAGGGCCTGATCTATCATGGAAACCA
 ACTTGGACGATGGAGTTCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGAGCCGATTAATCTCTCACCATCAGCAGCCTGGA
 ATCTGAGGATTTTGCAGACTATTACTGTGTACAGTATGGTCAGTTTCCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCCACCAAGCTGGAA
 ATCAAAC (SEQ ID NO:36)

D. Secuencia de aminoácidos

DILMTQSPSSMSVSLGDTVNITCHSSQDINSNIGWLQQKPKGKFKGLIYHGTLNLDGVPSPRFSGSGGADYSLTISSEDFEFA
 DYVCVOYGFPPWTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:37)
 CDR1
 CDR2
 CDR3

FIG.52 (continuación)

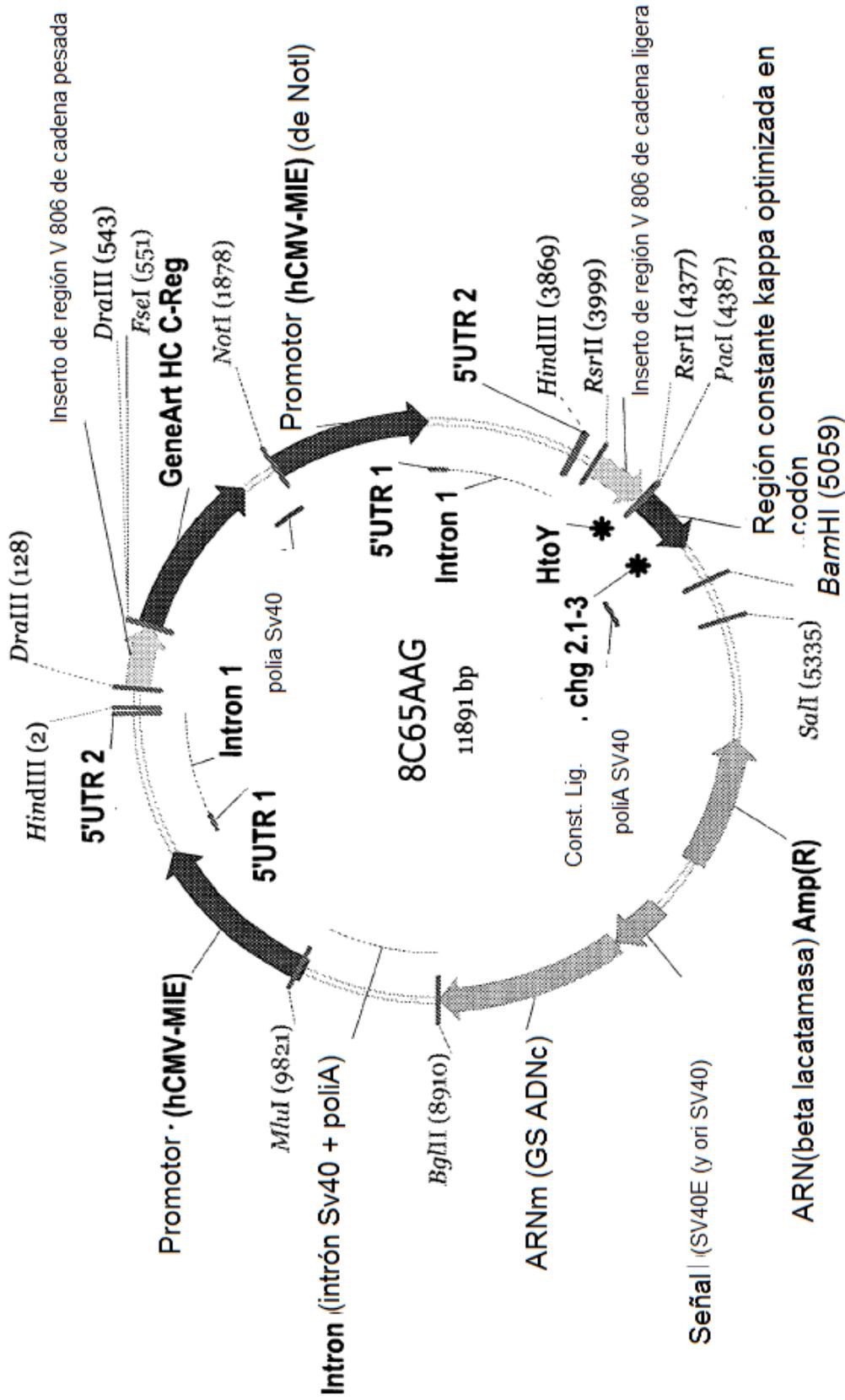


FIG.53

FIG. 54

```

HindIII
+1 M D W T W R I L L F L V A A A T
1 AAGTTGGG GCACTTGA TGGAGGAG GAGATTCG TGGAGTAG ACCGAGGAA GGTAAAGGC GGTAAATCG CAGTGGAG GAGAGGATCG
TTGGAAGGC GGTGGTACT AAGCTGGCG GATTAGAGA AAGAGTATG TGGGCAATTC TCATTCCGCG ACCGTTTAG GTCACGTCG CTTCCGTAAC
DraIII
+2 G V H E Q V Q L Q E S G
101 AAGTCAACA TCGAGCCAG TCAATCAGT AAGGAGCTT CATTCCACT CTTGTCCTC TCTACAGAG TACTATCGA TCTGAGGAGT CAAAGGATCG
TTCACAGGT ACGTTGGTC AGTGGTCAC TTCGCGGAA GTTAGTGG GACACAGAG AGATGTCCTC TGGGCGGAA GATGAGGAG AATGAGGAG
+2 G P G L Y K P S Q T L S L I G T V S G Y S I S S U F A W N W I R Q T
201 AAGTGGAG TGTGAGGAG AATGAGGAG TGTGAGGAG AATGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG
TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG
+2 P P G K G L E W M G Y I S Y S G R N T R Y D P S L K S R I T I S R D T
301 AATGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG
TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG
+2 S K N Q F F L K L N S V T A A D T A T Y Y D V T A G R G F P Y W G D
401 AAGTGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG
TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG
DraIII
+2 Q G T L V T V S S
501 AAGTGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG
TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG
+3 A S T I K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G U L V K
601 TTCTCTCC AGTGGTCA AAGTGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG
AAGAGAGG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG
+3 K D Y F P E P V T V S W M S G A L T S E V W T F P A V L Q S S E L Y
701 AAGTGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG
TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG
+3 S L S S V V T V P S S S L G T I G T Y T C N V N H K P S R I K V D K K
801 AAGTGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG
TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG
+3 K V E P K S C D X T H T C P P C F A P E L L G G P S V F L F P P K F
901 AAGTGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG
TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG TGTGAGGAG

```


FIG. 54
(continuación)

2301 TGTTGACATTT GATTTATTCAC TAGTATTATAA TACTATATCAA TTACGGGGTCC ATTATGTCAT AGCCATAATA TGGAGTTCGG CTTTACATAAA CTTTACGGTAA
 ACAAATGTAAT ATCAATATGTT AATGCCCCAG TAATCAAGTA TCGGTAAT ACCCTAGGGC GCANAGTATT GAATGCCCAT
 2401 ATGGCCCGCC TGGCGACCC CCCAAGACC CCGCCCAAT GAGTCAATA AHAAGTAAH TTCCATAGT AACCCCAATA GAGACTTTC ATTGACATCA
 TACCGGGGGG ACCGACTGGC GGGTGGCTGG GAGCGGTAAA CTCAGTTAT TACTGCATAC AAGGTATCA TTGGGGTAT CCGTGAAGH TAACTGCAST
 2501 ATGGGTGGG TATTAGGTT AACTGTTGA CTTGGGATA CATCAAGTAT AICATATGG AGTACACC CCTATTGAC TCAATGACGG TAAATGGCC
 TACCACCTC ATAAATGCA TTTCAGGTT GAACGGTAT GASTTICACA TAGTATACGG TTCAATCGGG GATATATGTC AGTTACTGCC ATTTACCCGG
 2601 GCGCGGCTTT AIGCCAGTA CATGACTTTC TGGACTTTC GACTATGCA GTATTATGCA TGGCTATTAC CATGGTATG CCGTGGTGG CCGTGGTGG
 CCGACCTTAA TACGGTAT GATGTTGAT ACCCTGAAG GATGAGGCT CATATGAGG CATATGAGT ACGTATATG STACCACTAC GCGAARACC
 2701 ATGATACAA TGGGATGGA TAGCGTTTG AATCCAGG ATTCACAGT CTCACACCA TTGACGTA TGGAGTTG TTGGGACC AATATCAGG
 TCAATGATTT ACCCGACT ATGCCCAAC TTAGTGGCC TAMAGTTCA GAGGTGGT AACTGCAT ACCCTCAAC AATACCGTGG TTATGTTGG
 2801 GGACTTCCA AATGTGTA ACACGTCGC CCAATTGAG CAAATGGG GTAGGTTT ACSTTGGG GTCTATATA GCAGAGCTG TTATGTAAC
 CTTGAAGTT TTACAGCAT TTTTGAAGG GGTATGCTC GTTACCCCG CATCCGACA TCCACCTTC CAGATATTT DGTCTCGAC AATACACTG

 2901 CCGTACATCG CTCGGAGAG CCAATCCAGC TGTATTGACC TCCATAGAG ACACGGGAC CGATCAGCC TCCGCGGCG GGAACGGTGC ATTGACACCC
 GCAGTCTAGC GGAGCTTGG GUTAGGTGG ACAAAAGTGG AGATCTTTC TGTGGCTG GTATGTTGG AAGGGGCGC DCTTGGCAGG TAACTTGGC
 3001 GGAATCCCG TCCACAGAT GAGCTATAG CCGCTATAG AHTATAGG CCGAGGCT TGGTCTTA TGCATGCTAT ACGTITTT GCTGGGGTTC
 CCTAAGGGC ACCGTCTCA CTGACTTCA GCGGATATC GGGTGGGGA ACCGAGAT AACTACGATA TGCATAAAC CGAACCCCG
 3101 TATACACC CCGTCTCA TGTATAGT GATGGTATG CTATGCTAT GATCGGATA TCCACACCA ATACTGTA AFAACTGAG AGGATATAC CACTGCTAG
 ATATGTTGG CCGAGGAT ACGATATCCA CTACATATC GAATCGGATA TCCACACCA ATACTGTA AFAACTGAG AGGATATAC CACTGCTAG
 3201 TTTCATATC TATATATA CATGGCTTT TGCACACTT CACTATATG CTAATGTC CTTACAGTA CTGACAGTA CTTATAT
 AAGGTAATG ATTTGATTT GATCCAGAA ACCGTGTTA GAGAAATAC CGATATAGG TTATGACCA GGAATGCTT GACTGTTGCT GAGATATAA
 3301 TTAGGAG GGTCTCAT TATTATTC AATTCAGT ATGACACC ACCGTGCTA GAGGCGGAG TTTTATTA ACATAGCTG GATGCTGAC
 AATGCTTAC CCAAGTAAA GAGCTGAC TTAGGCTGAG CCGAGAGAG CCAATGCGC CTGAAAGATG TAGGCTGGG ACGAGTAC GAGGCTGCT GATGCTGAC
 3401 CCGATCTCG GATAGTGT CCGACATGG GCTTCTCC GATGCTGAC GATGCTGAC ATGAGGCTG TCGTCCAGG CCGTCCAGG CCGTCCAGG CCGTCCAGG
 CCGTACAGC CCAAGTAAA GAGCTGAC TTAGGCTGAG CCGAGAGAG CCAATGCGC CTGAAAGATG TAGGCTGGG ACGAGTAC GAGGCTGCT GATGCTGAC
 3501 CCGGAGCT CTTGCTCT ACGATGAG GAGACTTA GGCAGCAC GATGCTGAC ACCAGCTG TGGGACAA GCGCTGCGG GTAGGTTAG
 GAGCTGCA GAAAGGAGA TTCTACCTC CCGTCTGAT CCGTCTGAT CCGTCTGAT CCGTCTGAT CCGTCTGAT CCGTCTGAT CCGTCTGAT CCGTCTGAT
 3601 TGTGAAA TACTGCTGG GAGGCTTT GAGGCTTA CCGCTGTA GCGATGGA AGCTTAAAG CAGCGGAGA AAGATATCA GCGCTGAG TGTGTTT
 ACGACTTTT ACTCGAGT CCGCCCGAA CCGGAGCT GGTAAACT TGTWATTC GTGCGCTG TTTCTAGT CCGTCACT ACGACTAC ACGACTAC
 3701 CTGATAGG TCGAGGTA CTCGGTTC GGTGTTTA ACGTGGAG CAGTGTAG CTGACAGTA CCGTGGT CCGGCTG CCGGCTG CCGGCTG CCGGCTG
 GACTATCTC AGTCTGCTT GAGGCAAG CCGAGCAAT TCGCAGTCC CCGTCACTA GACTGGTAT GAGCAAGC GCGGCTG CCGGCTG CCGGCTG

 *1
 3801 AATAGCTGAC AGACTAGAC ACTGTTCTT TCCATGGGCT TTTTCTGAG TCACCTGCT TGACAGAG CTTGCGGCA CCACTCATTT CCGTGGTGA
 TTATCGACTG TGTGATTTCT TGACAAAGAA AGTATCCGAG AATAGCTC ACTGCTGAG ACTGCTGAG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG GAGGCTG

M D W T W R

FIG. 54
(continuación)

```

+1 I L F L V A A A Y                               Resil
3901 ATATGCTG TGTATGAGAG GGTATGAGAGT AAGGGCTGC CAATCCAGS TGAGGAGAA GGTATCGAAG GTGACCATCG AAGCCATCA AAGGGGGGA
    TATGAAAS RACATGCTAS GCTTGTGCA TTCCGRCG GTTAGGCTC ACTCCCTCTT CCTAGCTTC CACTGTAGC TTCGTTCAGT TCCCCCGCT
Resil
+1 G V H S D I Q M T Q S P S S M S V S V G D R V
4001 CCGTTCAT CCACCTCTGT GCTTCCTA CAGGCTG CAGTATCT CATATGCTG ACATTCCTG CAGTATCTA GTTCGGGAG GATATAGT
    GCGAAGTA GGTGAGACA CAGAAGAT GTCCGAGC SCCTATGTA GTTCTCTGAG ATCAAGTAT GGTATGAGT CAGATGATG GTTATGCTGA
+1 V I I I C H S S Q U I N S N I G W L Q G K P G K S F K K G L L I Y H G I
    GAGATAGC TCCATGAA GDRAGPAGT CAGTATGAT ATTCGCTG TGAAGTGA GTTSTTAS TCGTGAAT GATATGTA TCGGAGCA TCGGAGCA
    CAGTATGAT GAGTATGTA GTTATGTA TATGATGTA GATGCTGTA CAGTATGTA AGCATGTA GATGATGTA GATGATGTA GATGATGTA
+1 N L D D G V P S K F S G S G I D Y I L I S S L Q P E D F A I Y
    AACTATG CAGGCTCA ATGAGT TCAAGCTG ATAGCTG TACTATG TCGATG ATGATGTA TCGATGTA TCGATGTA TCGATGTA
    TCGATGTA TCGATGTA TCGATGTA TCGATGTA TCGATGTA TCGATGTA TCGATGTA TCGATGTA TCGATGTA TCGATGTA TCGATGTA
+1 Y Y C V Q Y A Q F P W T F G G G T K L E I K R                               Resil
4301 ATATGCTG TGTATGAGAG GGTATGAGAGT AAGGGCTGC CAATCCAGS TGAGGAGAA GGTATCGAAG GTGACCATCG AAGCCATCA AAGGGGGGA
    TATGAAAS RACATGCTAS GCTTGTGCA TTCCGRCG GTTAGGCTC ACTCCCTCTT CCTAGCTTC CACTGTAGC TTCGTTCAGT TCCCCCGCT
Resil
+1 A N C T G R G G G H G T G G A T T G T T A C T T A A A C A C C A T C T G T T C C T A G G A A C C G T T T C C T A G G A
    T T G A G A C C C C A G C C T A C T T C A A G A G A T T T G T G T A G G A C A A C A G A A A A G A G A C T C T T C G C A G C C
    G A G G A G A C A C A G T A G A R
+1 P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K K V Q W K V D N
    C C C C A T C G A C G A G C A G C A G C C G T C G T T G A T C C T T A T A C T T T A C C A A A G A G G A A A C C C A G C C
    G A A G T G A G C C C G C T A T A C C A G A G C C A C C A G A G A G A A T T G A T T G A T T T C A G C A G A A T T C A
    G A T T G A T T C A G C A G A A T T C A G C A G A A T T C A G C A G A A T T C A G C A G A A T T C A G C A G A A T T
+1 N A L Q S G R S Q E S V I E Q D S K D S L Y S L S S L L L S S K A D
    C C C A G A A C A G C C A G C C A G C C A G C C A G C C A G C C A G C C A G C C A G C C A G C C A G C C A G C C A G C C
    T C C G A T G T G T T C C A G C C A G C C A G C C A G C C A G C C A G C C A G C C A G C C A G C C A G C C A G C C A G C C
    T C C G A T G T G T T C C A G C C A G C C A G C C A G C C A G C C A G C C A G C C A G C C A G C C A G C C A G C C A G C C
+1 D Y E K H K V Y A C E V Y T H Q G L S S P V T K S F N R G E C                               Resil
4701 ATATGCTG TGTATGAGAG GGTATGAGAGT AAGGGCTGC CAATCCAGS TGAGGAGAA GGTATCGAAG GTGACCATCG AAGCCATCA AAGGGGGGA
    TATGAAAS RACATGCTAS GCTTGTGCA TTCCGRCG GTTAGGCTC ACTCCCTCTT CCTAGCTTC CACTGTAGC TTCGTTCAGT TCCCCCGCT
Resil
4801 GTGGAGAG CCGAATTCAT TGTATGAGAGT AAGGGCTGC CAATCCAGS TGAGGAGAA GGTATCGAAG GTGACCATCG AAGCCATCA AAGGGGGGA
    CACGCTGCT GCGTTAGTA ACTAGTATTA GTCCGATG SGTATGATC TCCAAATGA ACGAATTTT TCGAGGCGG TCGAGGCGG CTTGGACTTT
    
```

FIG. 54
(continuación)

4901 CATAAATGA ATGCAATGGT TGTGTTAAC TGTGTTATN TGGTTADAAA TAAAGCAATA GCATCACAAA TTTCACAAAT AAAGCAATTT
 GTATTTTACT TACTTTACA ACAAATATG AACAAATAC GTCAATATTT ACCAATATTT ATTCGTTAT GTATGTTT AAATGTTTAA TTTCGTAATA

5001 TTTCACATGA TTCAATGAT GTTGTGACA AACTATCAA TGAATCTAT CATGCTGTA TCTCTAGGC CGAGCCATC GTGCGCGCA TCACCGCGC
 AAGTGACGT AAGATCAACA CCACACAGT TTGAGATTT ACATAGATA GTACAGACT ABRAGATGG CCTGCGTAG CACCGCCGT AATGCGCGC

5101 CAGAGGTGG GTTGTGCGG CCTATATCG GCATATACC GATGGGAG ATGGGCTG CACTTGGG CTAATAGCG CTGTTGCG GTTGGGTAG
 GTTCTCACG CAGCACCGG GATATAGG GCTGTATG CTAACCTTC TAGCCGAG GGTGAGGCG GAGTACTCG GACAAAGC GCACCCATC

5201 GTGCAAGCC CCGTGGCGG GGCATGTTG GCGCATCT CTTTGTATG ACCATTCCTT GGGCGGCG TGTCTAAGG CCTAACCCTA CTACTGCGT
 CACGCTCCG GGCACGCGC CCTATACAC CCGGATAGA GAACTATCG TGTATAGAA GCGCCCGCGC ACGATGTC GAGTGGAT GATGACCGA

5301 GCTTCCATAT GCABAGTGG CABAGAGAG ACGATGAGC TGGCTGGGT TTTTCCATG GCTCGCGCC CCHGAGCC ATCAGAAA
 CGAAGATTA GTCCTCAGC GTATTCCTC TCGCAATGG ACGCCGCGC AAGTACCGCA AAGATGATC GAGCGGCG GGAATGCTCG TAGTGTTTT

5401 TGCACCGTGA AGTACAGGT GCGAAACG GAGAGAGTA TARGATACC AAGGCTTCC GCTGGAAT TCGCTGTG GCTCTGCTGT TCGACCGCTG
 AAGTGGAGT TCAATGACA CCGCTTGGG GTTCTGAT ATTTCTAGG TCGCAGAG GAGACTTGG AAGTAGCAGG CGAGAGACA AAGCTGGAC

5501 GCGCTTACG GATCTATG GCGTCTTC CTTTGGAA GGTGAGCT TCTCTATC TCACTGTA GATCTGTA GATGAGTGG TCGGTTAG GATGTTGCT
 GCGAATGGC CTATGACAG GCGGAAGAG GBAAGCCTT GGCACCGCA AAGATATCG AATGCGACT CCAIAGATC AAGCCATC CABAGAGCA

5601 CCAAGCTGG CTGTGTGAC GATCCCGG TCAACCGA CGCTGCGC TTATCCGTA ACTATGCT TCACTCAC CCGTATAG CCGATGAC ACGATTA
 GCTTGCAGC GACACAGCG CTGCGGCG AATCGCGT GCGACCGG AATAGGCA GATATAGCA ACTCAAGTG GCGATGTC GCGATGTC TGTGATAG

5701 GCGACTGGA GAGCGCTG GATAGAGT TAGCGAGG AATATGAT GCGCTCTAC AAGTCTCT GATGAGTG CTAATAGCG CTACACTAG
 GCGTACCGG GTTGGGTGAC CATTGCTA ACGTCTCG TCCATATC CCGCAGATG TGTCAAGAC TTAGCAGCG GATTGAGCG GATGATCT

5801 AGACAGTAT TTGTATGCG GCGTGTGAG AAGCAGTTA CTTTGGAA AAGATGCG AACTCTTAT CCGCAGAC AAGCCGCG GATGCGGTG
 TCTGTGATA AACCATAGC GCGAGAGAG TCGGCTAAT GBAAGCTT TCTCAACA TCGAGAATA GCGGTTTGT TTGTTGCG GATGCGGTG
 CAAAATAA AAGTGTGTC GCGAATGG GTCCTTCT TCTAGATG AATAGAAAG ATGCGCGCA GCGGCTAGT GBAACGAA

5901 CCGACTTAA GGAATTTGG TCATAGAT ACCAAGAG ATCTTACT AATCTCTT ADATTAAA TGAATTTTA ATCAATCA AATATATAT
 GATGCAAT CCTTAAACC AGTACTTAA TAGTTTTCC TAGAGTGA TTAGTAAA TTTATTTT ACTCAAAI TAGTATAG TCTATATA

6001 GAGTAACTT GGTGTGACG TTACGATG TAAATAGG AAGCAGTAT CTACGCGTC TGTCTATTC GTATGCTAT AGTGTGTA CTCCCGTC
 GTCATTTGA CCGACTGTC AATGATAG CCGTGTGA GATGCTAG AAGATAAA GATGAGGTA CAAATAGG GATGAGGACT GATGCGAGC

6101 TGTAGATAC TACATPAG GAGGCTTC CATGCGCC GATGAGTCA AATATAGC GAGCCCGC CTGCGGCT CCAATTTAT CAGCAATA
 AGATCTATG ATGATAGG CCGCGAAT GTAGAGCG GTACGAGT TACTATAGG CTTGCGGCG GATGCGCG GATGAGGTA GTCATATAT

6201 CCAAGCAGC GBAAGGCGG ACGGAGAG TGGTGTGCA ACTTATCG CTTCCATGA GATATATAT TGTGCGGG AAGCTAGT AATATATC
 GGTGGTGG CCTTCCCGC TCGGCTTC ACCAGAGT TGAATAGC GBAATAGT CAGATAATA ACAAAGC TCTATCTCA TCTATCAGC

6301 CAGTATTA GTTGGCGA GGTGTGTC ATGCTACG GATGCGGG GTACGCTG TGTGTTGTA TGGTCTAT CAGCTCGT TCCACAGT
 GTCATATAT CAAAGGCTT GCACACAG TACAGATC GTAGAGCA CAGTGGAG ACAAACAT ACAAAGTAA GTCAGCGCA AAGTCTTA

FIG. 54
(continuación)

6501 CAAAGGCGAGT TACATGATCC CCGATTTTGT GCANAAAGC GGTAGCTCC TCGGTCCTC CCAATGTTGT CAGAGTAAG TTGGGCGAG TTTTATGACT
 GTCCCGTCA ATGTACTAGG GGGTACAACA CGTTTTTGG CCAATCGAG AGCCAGAGG GGTAGCAACA GTCTCATTC AACCGCGTC ACAATATGTA

6601 CATGGTTATG GCAACACTGC ATAACTCT TACTGCATG CCAATCGTA SATGCTTTC TGTGACTGAT GAGTACTGA CCAAGTCAAT CAGAGATAG
 GTACCAATAC CGTCGTGAG TATTAAAGA ATGACATAC GGTAGCAAT CTAGGAAAG ACACTGACCA CTTATGAGTT GGTTCAGTAA GACTCTTATC

6701 TGTATGGGC GAGGAGTTC GTCGTGCGG GGTCAATAC GGGATATAC DCGGCCAAT AGGAAACTT TAAATGCT CATCATLGA AAACUATCTT
 ACAATAGGCG CCGCTCAAC GAGACGGGC GCGATATG CCTATATG GCGGTTATA TCTCTTAAA ATTTTCAGCA GTAGTAACTT TTGCAAAA

6801 GGGGGGAAA ACTGCAAGG ATCTTAGGC TGTGTAGAC CAGTTCATG TACCCACTC GGCACCCAA CTGACTTCA GCATCTTAA CTTCACAGG
 GCGCCGCTT TGAAGATTCC TAGAATGGC ACAACTTAG GTCABCTAG ATTGGGTCAG CAGTGGGTT GACTAGAAGT GGTAGAAAAT GAAAGTGGTC

6901 CTTTTCTGG TGGCAAAABA CAGGAGGCA AAATGGCGA AAAAGGAAA TTAGGGCGA CCGGAATGT TGAATACTA TACTTCTCT TTTTCATAT
 GCAAGAGCC ACTGTTTTT GTCCCTCCT TTATGGCCT TTCCCGGTT ATCCCGGTT TGCCTTTACA ACTATGAGT ATGAGAGGA AAAATTTAAA

7001 TATTGAGCA TTATACAGG TTATGTCYC ATGGCGAT ACATATLGA AHTATTTAG AAAAAMAC AAATAGGGT TCCGKACAG TTTCCCLAAA
 ATACTTGT AAATAGTCC ATACACAGAG TACTGCTTA TATAAANT TACTATAAT TTTTATTTG TTTATCCCA AGCGGCTG AAAGGGGCTT

7101 AAGTGGACC TGGGTGAAA GAAACATTA TATGATGAC AHTAGCTAT AAAATAGGC GTATCAGGAG CCGCTGAGG CTGTTTGGG CACCCATGCT
 TTCACGTTGG ACTGCAGATT CTTTGTAAT AATAGACTG IAATTTGATA TTTTATCCG CATAGTGCCT CAGAACTCC GAGAAAGCC GTGGGTAGCA

7201 TGTAAATTT CCGTGGCACC GAGGACACC CTCAGAGAA AATGATACA LACTGGCTA CTTCCGGGT GGCCTTTCG GCTTATAG GATACACTT
 ACAATTAACA GGCACGGGG CCGCTGTTGG GAGTCTCTT TTACATPAGT GAGACCGAGT GBAAGCCAC GCGAAATATC GTCTGAGAAA

7301 AATTTTAAA AGTTTGTAA ATTCGTTGG GCTTGGAG CCAAGTAGA TCGGGCTG GATGTGXI CAGTATGGT GTGAAATC CCGAGGCTC
 TACAATCT TCCAACTAT TAAAGACGC GAAACGCT GGTCTGACT AGCGGACAC CTCACACA GTCATCCCA CACTTCCA GGTTCGAGG

7401 CCAAGAGCA GAGTATCCA ARGATGCTAT CTCATTTAG CAGCACTAG GTTGGAAAG TCCCAAGCT CCGAGCAGG CAGAAATAG CAAAGATGC
 GGTCTCTCT CTTCATACT TTCTAGATA GASTAATCA GTGTTGCTC CACACTTTC AGNCTCCGA GGGTCTCC GTCTTCAATC GTTCTGATC

7501 ATCTGATA CTCAGCAC ATATCCCGC CCGTACTCC GCGCATCAG CCGCTACTC GCGCAATCT CCGCAATCT CCGCAATCT CCGCAATCT
 TAGATTAAT CAGTGGTGG TATCAGGGGG GGGATTGAG GGGTATGAG GGGTATGAG GGGTATGAG GGGTATGAG GGGTATGAG GGGTATGAG

7601 TTTTTTATT TATCAGAGG CCGAGGCGC CTGGCTCT GAGTATCTC AGAGTATCT AGAGGCTCT TTTGGAGCC TAGCTTTG CAARAGCTA
 AAAAATAA ATAGCTCC GGCCTCGGC GAGCGGAG CTCGATAGG TCTTATCAC TCCCTCGAAA AAATCTCCG ATCCBAAAC GTTTTTGAT

7701 GCTTGGGCC ACCCTCAGA GCACCTTCA CCAAGCCAC CTCAGTAGT TCCACTTGA ADAAAACAT CAAGAAAAG TACTTGTCC TCCCGAGGG
 CBAACCGGG TGTGGAGTCT GGTGGAGGT GGTACGGTG GASTCTTCA AGGTGACT TTTTTTGA GTTGTATC ATGAAACGG ACCGGGTC

7801 TGAAGAGTC CAGGCTATG ATATGTTGG TGAATGACT GGGAGGAC TCGCTGCA AKCCGCGAC CTGACTGTG ACCCAAGTG TGTADAGAG
 ACTCTTTAG GTTGGTACA TATAGCCA ACTTCATGA CPTCTCTG ACCCGACT TTGGGGTAC GACTGACAC TCGGTTAC ACATCTTCT

7901 TACTTATG GAAATLGA TGGCTTAGT ACCCTTAGT CTGAGGCTC CACAGTAC ATGATCTGA GCGCTGTC CAITTTGG GACCCCTTC
 AATGACACA CCTBAAACT ACCGATCA TGGAAATCA GACTCCGAG GTGTCACTG TACTAGAT GGGCAGAC STACAAACC CTGGGAGG

8001 GAGAGATCC CACAGGCTG GGTGTTGAG AGTTTCTA GTACACAG AGCTGAG AGACBATT AAGCACTG TGTADAGGA TATGGACAT
 CACTCTTAG GTTGTCTG CACAGACAC TTCAAAGT CATGTTGCC TCGGCTCA TCTGTTAA TCTGTTAG ACATTTGCT ATACTCTGA

8101 GGTGGCAC CAGCACCTT GGTGTTGAT GAGAGGAG TATCTGTA TGGGACAAA TGGGCTCT TTTGTTGG CTCCAAAG CTTCCTGG
 CCCTCTTG GTGTGGGA CCAACCTTA CTTGCTCTC ATATGACT ACCTTCTCT ACCCGTGA AATCCNACG GAGGTTACC GAAAGGACC

FIG. 54
(continuación)

8201 CCCAAGGTC CGTATACATG TGGTGGGGC GCAGACAAG CCTATGSCAG GATATCGTG GAGGCTGCT ACCGGGCGTG CTTGTATGCT GGGGTCAAGA
GGGTTCCAG GCATATGAC ACCACAACG CGTCTGTTTC GGTATAGGTC CCTNAGCAC CTCCGAGTGA TGGGCGGAC GAACATADGA CCCAGTCT
8301 TTACAGGAC AATGCTGAG GTATGCTG CCTCAGTGA ACTCCAAATA GAGGCTGAG AAGGATCGG CATCTCTGG TGGCCGTTT
AATGTCCTTG TTACACATC CAGTACGGAC GGGTACCGT TTAGGTTTAT CTTGGGACAC TCTCTTAGGC GTACCCTCTA GTAGAGGCC ACCGGSCAAA
8401 CATCTTGCAI CGATTAATG AGACTTTGG GGTATATAGA ACTTTGACC CCAAGTCAI TCTGTRNAC TGCANTGGTG CAGCTGCCA TACCACCTT
GTAGAACGA GCTATACAC TTCTGAACC CCATTAFCG TGGAAATGG GGTTCGGGA AGGACCGTTG ACCTTACCAC GTCCGACGGT ATGGTTGAA
8501 AGCACAGG CCAITGGGA GAGATGTT GAGAGACA TCGAGGAGC CATCGAATA CTAAGCAAGC GGCACCGGA CCACATTCGA GCTIAGGATC
TGGTGGTTC GGTAGGCTT CACTTACCA GACTTGTGHT AGCTCTCCG GRACTCTTT GATTCGTTG DNTGGGCT GGTIATAGCT GGAATGCTAG
8601 GAAAGGGGG CCTGACNAI GCGGTGGTC TGACTGGGT CCAAGAAAG TCCACATCA AGRACCTTTC TCGTGTGTC GCGNATGCA GTRCAGGAT
GGTCCCGCC GGAICTGTA GGGGACCCAG ACTGACCAA GGTGCTTGC AGGTGTAGT TGCYGAAG AGGACACAG GGTATAGCT CAGGTGGTA
8701 GGCATTCGC CGACTGTC GCGAGGAA GAAGTATAC TTGASAGC GSHGCCCTC TGGCAATGT SACCCCTTG CAGTACAGA AGCCATGCTC
GGGTAGGG GCTGACAGC GGTCTCTTT CTTCCAAIG AACTTCTGG GCGCGGGAG ACGTTRACA CTGGGGAAC GTCACTGCT YCSTAGCAG
8801 GGCATGTC TTCTCATTA GACTGGGAC GAGCCCTTC AATACAAAA CTAATATAGC TTGAGTGT DTTGAGGCTT TCTAGTTCA TCCGACCCG
GGTGTACAG AAGATTACT CTGACGCTG CTCGGAAAG TTAGTTTTT GATTAATCTG AACTOACTA GAACTOGAA AGANFCAAT AGSSTGGGG
8901 CCCAGAGAG ATCTTTGTA AGGACCTTA CTCTGTGTT GTGACAAAT TGGACAAGT ACCTCAGAG ATTTAAGCT CTAAGTAA TATAAATTT
GGGTCTCTC TAGAACACT TCTTTGGAAT GAAGACACA CACTGTATA ACTGTTTGA TGGATGCTC TAAATTTGA GATCCATTT ATATTTAAA
9001 TTAGTGTAT AATGTTTAA ACTAGTAAI CTAATGACTA GATTACAAA CACTAATAT CTAAATGAG ATGATGGA CAGTGGTG AATGCTTTA
AATCACATA TTACAAAT TGAATGACTA TACTACTC ACTACTACT CAGTACGAC TGAAGTGT AGATGAGA GSHTTTTCT TCTCTTCCA
9101 ATGAGAAA CCHTTTTGC TCAGAAAA TGCATCTAG TACTACTC ACTACTACT CAGTACGAC TGAAGTGT AGATGAGA GSHTTTTCT TCTCTTCCA
TACTCTTTT GGACAAAAG AGCTCTCTT ACGTACTC ACTACTACT CAGTACGAC TGAAGTGT AGATGAGA GSHTTTTCT TCTCTTCCA
9201 AGAAGCCG AAGACTTC CTTCAGATT GCTAAGTTT TGGTACTG CHTGTTAG TAAATAGT CTGCTTCT TACTATTA CACCACAAAG
TCTCTGGG TTCTGAAAG GAAGCTTA CATTGAAA AACTCAGTAC GACACAAATC ATATCTTGA GACGAAAGA AAGATAAT GTGGTCTC
9301 GAAAGCTG CACTGCTTA CAGAAAT ATGGAAT ATTCGTAAC CTTTATAGT AGGCTACA GTTATATCA TACATACG TTTTCTTTA
CTTTTGGG GTGAGATAI GTTCTTTAA TACTTTTAA TACATTTAA TAGACATTC TCGTATGT CAATTTAG ATTTGATGAC AABAAGAAAT
9401 CTCACACAG GATAGAGTG TGTGCTATTA ATAGCTAG CTAATAATG TGTACTTAA GCTTTTAA TGTAAAGG GTTATAGG ATATTTGAT
GAGTGTCT CGTATCTAC AGCCGATAT TATGATAG AGTTTAC AGTTGAA CAAATTTA ACATTTCC CAATTTCC TTATAACTA
9501 GTATAGTGC TTACTAGAG ATCAATAT CCACTAGC ATTTGAGG GTTTACTG CTTTAAAA CTTCCACAC CTTCCCTGA ACCTGAACA
CAATACCG AACCTATC TACTATAGT CCGTATGCT TAACACTC CAAATTTT CAATTTT GAGGGTGT GAGGGGAC TGGACTTGT
9601 AATAAGAA GAAATGTH TGTAACTT CHTATAGG GTTACAATA AAGCAATG ATCAAAAT TCAAAATA AGAATTTT
ATTTACTTA GGTAAACAC AACAAATGAA CAATATAGT GAAATATAC CAATTTAT TCGTATAG TACTTTAA AGTGTATT TGTAAAAA
9701 TCACTGCAI CTAGTGTGG TTGTCCAA CTAATAGG TACTATCA TCTGATC TCTGATC TAGGGAGG TCACTGCAI GAATAATA
ATGACGTA GATCAACAG AACAAATTT GATAGTAC ATAGAAAT ACAGACTAG ATGCAACAC AGTTCCTCC CTTATATT

FIG. 54
(continuación)

9801 AAGTGTGCTT GTCGGAAATG CCGGTTTTGA GATTCCTGTC GCGGCTAAA TTGATGTCGC GCGTNGHGG TTTTATCGC CGTAGAGAT GCGGATATYG
 TACACACAA CAGCCTTAT GCGCAAACT CTAAGAGAG CCGCTGATY AATPACASG CCGTATCAC ACAAATAGCG GCTATCTCTA CCGGTATAC
 9901 GAARATCGA TATTGMAAA TATGGCAT TGAARATGTC GCGATGISA GTTCTGSH ACHGATAG CCGATHTTC CAARAGTAT CCGTAAAAG GTTTCACCTA AAAACCGTA
 CTTTTAGT ATAACTTT ATACCGIATA ACTTTTACAG CCGCTACACT CAAGACACA TTGACTATAG CCGTAAAAG GTTTCACCTA AAAACCGTA
 10001 ACGGATATC TGGGATACC GCHTATATG TTHAGUGG AUHGCGTAG ACGACTTGG TGACTUGGC GATCTGIGI GTTCARAYA TCGCATTTTC
 TCGCTATRG ACGGCTATG CQANTATAC AAATGGCGC TAGCGTATG TCGTGAAC ACAGACGGG CTAAGACACA CAGCCTTAT ACGGCTAAAAG
 10101 GATATRGTG ACAGACATA TGAGCTAAA TCGCGGATAG AGGACACAC AGCTGHCAC ATGGCAATG CHATGGAC TAAATATTG ATCAATATG
 CHTATACC TGTCTGTAT ACTCGGAT AGGGGTATC TCGCTGTAG TTGACCGTG TCGGCTTAC ATATAGCTAG ATATGTAAT TAGTATAAC
 10201 GCGATAGCC ATATTATCA TTGGTATAT ACATATATC AATATTGCT ATGGCCAT TTACACTTG TACCATATG ATATATGTA CATTTATAT
 CCGTATCGG HATAATAGT AACCAATNA TCGTATTAG THTNACCGA TAAACCGTA CHTATTAGS ATAGTATAG TATATACAT GTAAATATA
 10301 GCTCANGTC CARCTTACC GCAAGHTGA CHTGATAT TACTAGTA TTAATAGTA TCAATTAGG SHGATTAGT TCAAGCCCA TATATGAGT
 CCGAGTACAG GTGTATAG CCGTACACT GTAACHATA ACTGNTCAT AHTATCAT AGTAAATGC CAGTAAATCA AGTATGCGT ATATAGCTCA
 10401 TCGCGTAC ATACTTACG GTAATGCG CCGCTGGTG ACGGCCAG GAGCGCGGC ATTTAGGTC ATATAGAG TATGTTCCA TAGTATGCG
 ACGCGCAATG TATTGATGC CATTTACCG GCGNACGAC TCGCGGTG TCGCGGCGG CTACTCTGC ATACAGUST ATCATTCGG
 10501 AATRGACT TTCAATGAC GTCAATGGT GAGTATTA CHTATAGS CCACTTGG AGTACTCA STTATCTTA TCGAAGTAC GCGGCTATY
 TATCCGTA AAGCHACTG CACTTACCA CHTATAAT GCAATTCAG SHTGAACG TCAATAGT CACAATAT ACGTTCATG CCGGATATA
 10601 CAGGCHATG SHGTAAATG GCGGCTGCG CATTAHCC ATACAHGC CHTATGAC TTGCHACT GGHATCAT CHTATATA GTCAAGCTA
 CTGCACTAC TCGCATTAC CCGGCGAC GTAATCGG TCAATGACT GAAATCGGT AAAGATGAA CCGTAAATTA CHTGATAAT CAGTACGTA
 10701 TTACCAHGT GATGCGHT TTGCAATG TCAATGCGG THTGACTAC SHHTATIL AGLTCTGC CCGTTCAC CCGTTCAG TCAAGCGAG
 AATGHTACA CTACGCGAA ACGTCAATGT ACTATCGC AACTGAGT CCGCTAAG TTGAGAGTG GGTAACTGC AGTTACTCTC
 10801 TTGTTTTG CACCAATC ACGGGATY TCAAAATY CHTACACT CCGCCCATY GAGCAAAH GCGGCTAGC GTTACGCTG GAAHGTAT
 AAACAAAC GTGTTTTAG TTGCGCTGAA AGHTHTACA GCAHTGTA GCGGCGTAT CTGCGTTAC GCGCATCG CAGATGCC CCTGCGATA
 10901 ATAGCAGAG CTCGTTAGT GAACCGCAG ATGCGCTGA GAGCCATG ACGTGTHT GACTOCATA GAACACAG GAGCGATCC AGCCTCCGG
 TATCGCTC GAGCAATCA CTGGCAGT TACCGGACT CTGCGTAG TCGNCAAA CTGAGGAT CTTCGTGCG CCGCTAGG TCGSAGCGG
 11001 CCGGMAAG GTGCAATGA ACGGGAATC CCGTGCAA GATGACTA ATAGACTA TAGGCCACC CCTTGGCT CTTATGCTAG
 GCGCCCTGC CAGTACCT TCGCCDAG GCGACGHT CTACTGAT TATGCGGA TCTAGAT ATCGGCTG GAGACGGA GATYACAT
 11101 CTATAGT TTGGCTG GACTATA CCGCGCTC GCAATAT AGGATATG ATAGCTAG CHTAGGHT GATATAG GGTATAGA CCAATATGA
 GATATBAAA AACCGAAC CAGATATG GCGGCGAG GATACATA TCACTACA TATGATAG GATFCCA CCAATAACT GATATACT
 11201 CCACTGCT ATGCTGAG ATACTTGA TACTATAC ABACTGCG TCTTGGC AACTCTIT ATGCTATA TCGAATCA CTGTCTCA
 GGTAGGGA TACCACTGC TATGAAATG AATGATAG TATGTACG ABACTGCG TTAGGAAA TACGATAT ACGTATAT GACAGGAT
 11301 GCACTGCA CCGACTCT ATTTTTAG GAGGGGAT CATTTAT TTAARATC ACATATCA CAGACGCT CCGCTGCC CAGTTTTA
 CTCGACTGT GCTGAGCA TAAATGCT CTACCCGGA GHAATATA AATGTTAG TGTATGT GGTGCGCAG GGTACCGG GGTCAAAAT

```

11401  TTAAGATATA GGTGGGAGCT CCAGCCGAAI CTCGGHTAG TTTCCGHEAC ATGGHCYOTI CTCGGHTAGC GGGGGAGCTT CTACATCGGA GCCCTCUCIC
    AATTEWAT GCACCCCTAGA GGTGGGHTA GAGCCCAATC ACAAGGCTG TACCCGAGA GAGCCCAATC CCGCCCTGAA GATGTAGCT CCGGACGAGG
11501  CATGGCTCA GCGACTCATG GTGCTCGC AGCTCCTTC TCTTAGAGT GGAGGKAGA CTTAGGACA GACGATGAC CAGCACCC ATBTGKXBC
    GTACGGAGT CGCTGATATC CAGCGAGCS TCGAGGACG AGGATTCICA CCTCCGCTC GATCCGCTT CTGCTTAGC GTGGTGGTG TCCACCGCG
11501  ACAAGGCTT GCGCGTAGG TATGIGTTCG AAAATGANT CCGGAGCGG GCTTGCAAT CIGACGCAT TGGARACTT AAGGCARCGG CAGAGAGA
    TCTTCGGCA CCGCCATGCC ATACACAGAC TTTATACGA GCGCCCTGSC CGAAGGTGGC GACTGGGTAA ACCCTTCGAA TCGGCTGGCC GTCCTCTCT
11701  TGCAGGCAC TGAATTTTGG TTTTCHATA AGAGTCMBG GTAATCTCG TTGCGGHTT GTHAACGHS GAGGGHAGT TACTCHGAC AGTACTCGT
    AGTCCGTTG ACTCAGCAC ACAGACTAT TCTCAGTTC CATTGAGGC ACGCCACGA CATTGCCAC CTCCGCTAC ATCAGACTCG TCATGAGAA
11801  GGTGCGGGC GCGCCACCG ACATAATAG TGCAGAGTA ACAGACTGT CTTTTCAIG GGTCTTTCT GAGTCAIG TCTTTGAC G
    GSNCGGCGG CCGGTTGGT TGTATTATG ACTGTCTAT TGLTGCACA GGAAGGTAC CCGAALAGA CGTCAHTGG CAGGACTGTG C

```

FIG. 54 (continuación)

Cadena pesada

FIG. 55A

Señal MDWTWRILFLVAAATGVHS

V_H
 Q V Q L Q E S G P G L V K P S Q T L S L T C T V S G Y S I S S D F A W N W I R Q
 P P G K G L E W M G Y I S Y S G N T R Y O P S E K S R I T I S R D T S K N Q F F
 L K L N S V T A A D T A T Y V C V T A G R G F P Y W G Q G T L V T V S S

C_R

ASTKGPSVFLAPSSKSTGGTAAAGCLVKDYKDPPEPVTVSWNSGALTSGVHIFPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQFYICNV
 NHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHICPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEYTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
 HNAKIKPREEQNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYI LPPSRDECTKNQVSLT
 CLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVPSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena ligera

FIG. 55B

Señal MDWTWRILFLVAAATGVHS

V_L
 D I Q M T Q S P S S M S V S V G D R V T I T C H S S Q D I N S N I G W L Q Q K P
 G K S F K G L I Y H G T N L D D G V P S R F S G S G S G T D Y T L T I S S L Q P
 E D F A T Y Y C Y Q Y A Q F P W T F C G G T K L E I K R

C_L

TVAAPSVFIFFPPSDEQLKSGTASVVCILNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSLITLFSKADYEEKHKVY
 ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Mapa de residuos expuestos en la superficie para la remodelación de mAb 806 VH **FIG. 56A**
 mAb 806 Subgrupo VH-I murino de cadena pesada (Homóloga a subgrupo II humano)

```

* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
DVLQESGSPSLVKESQTLISLTCIVTGYSLTSDFAANNWIRQEPGNKLEMMGYISYSCNTRYNPSLKSRISLTERDTSKNQFFLQLN
E H D S S D S D Y- Y- K Y S Y H S N S Y
GYS H NGF- I K Y Y S Y

```

Consenso Q A G T S F L G Y D S F L G Y P KA RG M L I M LT V R K V R S V T S K F Q

Residuos a cambiar
 Q G S S S P KG T S

```

QVQLQESGPGLVKPSQTLISLTCIVSGYISISSDFAANNWIRQEPFGKLEMMGYISYSCNTRYNPSLKSRITFTRDFSKSQFFLQLN
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
SVTIEDTATYYC---VTAGRGFPY---WGQGGLVTVSA
S T T G ACRYGRTPYEFD T S
ARIYYGSSYWFAY

```

FIG. 56B

VH36 AAA3794L CAD2681C
 Consenso EV AA SE AP JH1,4,5

Residuos a cambiar
 S

```

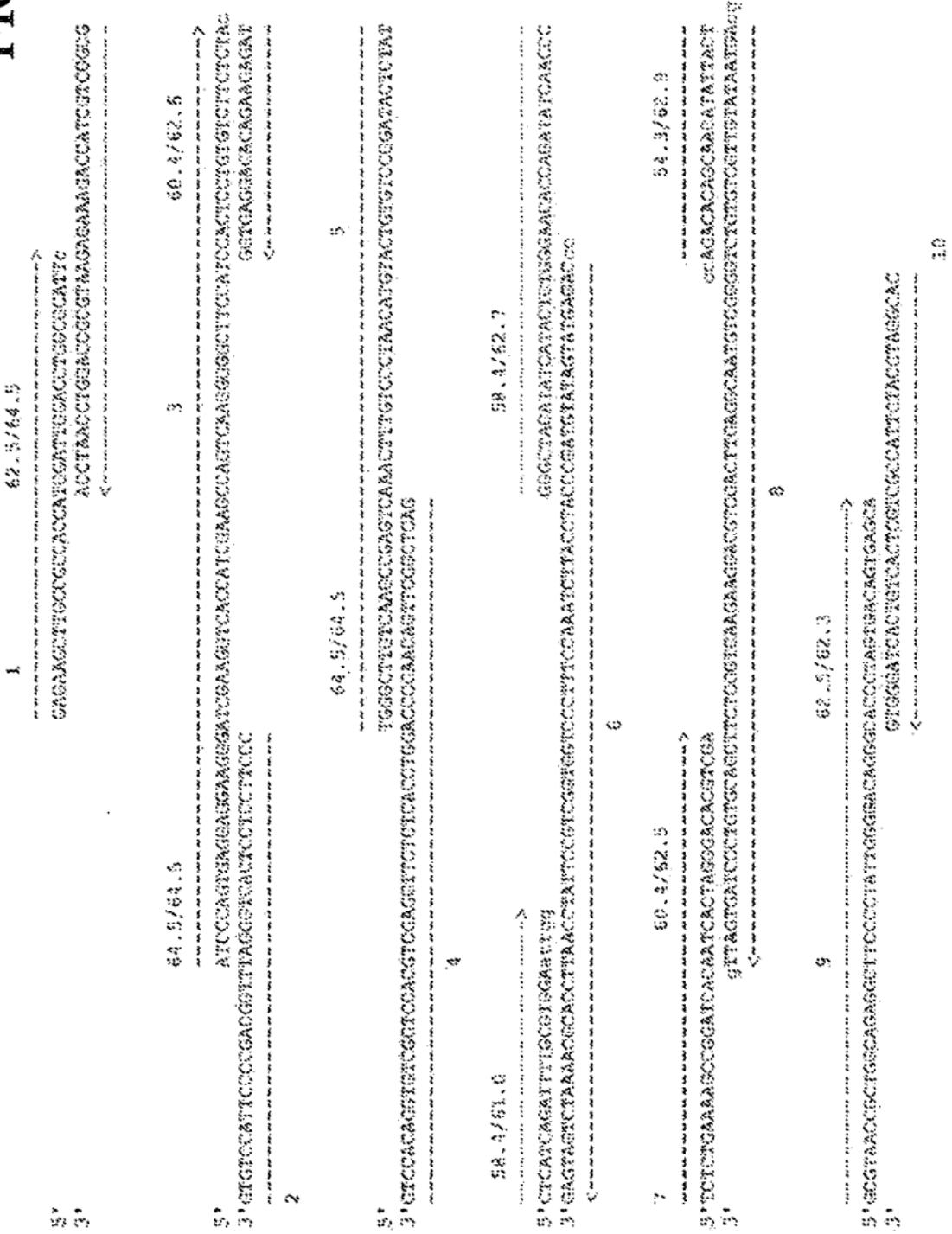
SVTAPDPTATYYC---VTAGRGFPY---WGQGGLVTVSS

```

Clave: CDR están en rojo; *residuos expuestos a la superficie (más * indican más exposición a la superficie); N, potencial sitio de glicosilación

Mapa de solapamiento de oligonucleótidos iniciales para el diseño de VH de 806 remodelado

FIG. 56C



Clave: minúscula : añadir a oligo; mayúscula: eliminar del oligo. - Esto se realizó para incrementar la Tm de los oligos de solapamientos utilizados para sintetizar la región V

Mapa de residuos expuestos a superficie para la remodelación de VI de mAb806

mAb 806	(Subgrupo Kappa murino de cadena ligera)	(Homólogo a subgrupo I kappa humano)
CF9germ	*** * *	*** *
CAB46157	** * * * *	** * *
AAS01772	* * * * * *	* * * * *
Consenso	Q V A V R T E A G S W I A Y K A P L D A S S Q S G	Q V A V R T E A G S W I A Y K A P L D A S S Q S G

FIG. 57A

<u>Residuos a cambiar</u>	Q V R T	K	G
mAb 806	D I Q N T Q S P S S M S V S V G D R V T I T C H S S Q D I N S N I G M L Q Q F K S F K G L I Y H G T N I D D D V P S K F S G S G S G		
CF9germ	A G S	K	E G
CAB46157	A G S	E G	
AAS01772	Q V A V R T E A G S W I A Y K A P L D A S S Q S G		
Consenso	Q V A V R T E A G S W I A Y K A P L D A S S Q S G		

FIG. 57B

<u>Residuos a cambiar</u>	T T P T	E	JL-4
mAb 806	A P Y S L T I S S L E S E D F A D Y I C V Q Y A Q F W W T F G G T K L E I K		
CF9germ	Y		
CAB46157	Y		
AAS01772	P P T Q P T Q A N S L V		
Consenso	T P T Q P T V		JL-4

Clave: CDR están en rojo
 * residuos expuestos a la superficie (más * indican una mayor exposición a superficie)


```

541 CCCAGAGGTTBAAGTTCCAAATTCCTATCTGTGGACCGCGCTGDBASGTGCRCAAGCCCAAGACCGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGGTCTCCACTTTCAGCTTAACCATACACCTGCGCGCACCTCCACCTTGTTCGGSTTCTGGTT
P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K

601 GCCUAGAGAGAGACAGTACAAACAGCACCTACAGGGTGGGTGTTCGGTTCCTGACCGTCTGCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGGGTCTCTTTCTCGTCAATGTTGTGTGGATGTCGCCACACAGGCACGACTGSCACAGACGT
P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H

BstNI BsaI
661 CCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAATGCAAGGTCTCCACCAAGGCCCTGCCAGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GCTCTGACCGACTTCCCGTTCCTTATGTTTACGTTTCLAGAGGTTGTTCCGGKACGGTCC
Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A

BstNI
721 CCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGSGCCAGCCACGGGAGCCUCCAGGTGTACAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGGGTAGCTTTTCTGGTAGTCTTCCGGTTCUCCGCTGCTGTGCCCCCTCGGGGTCCACATGTC
F I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T

SmaI BstNI
781 CGTGGCCCCCTCCCGGGGACGAGTGCACCAGGAACCAAGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGACGGGGGGGAGGGCCCTGCTCAAGTGGTCTCTTGGTCLACAGGGACTGGACAGACCACTT
L P P S R D E C F K N Q V S L T C L V K

841 GGGCTCTACCCCCAGGACATCCCGCTGGGAGTGGGAGAGCAACGGUCCAGCCCCAGAACCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CCCGAAGATSSGGTCCCTGTAGCGGCACCTCCACCTCTCTGTTGCCGGTCCGGCTCTTGT
G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N

901 CTACAGACCCACCCCCCGTCTGACAGGUAACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAGTCTCTGCTGGGGGGGTCACGACCTGTCGGCTGGCCCTCGAAGAAGGACATGTGCTTCA
Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L

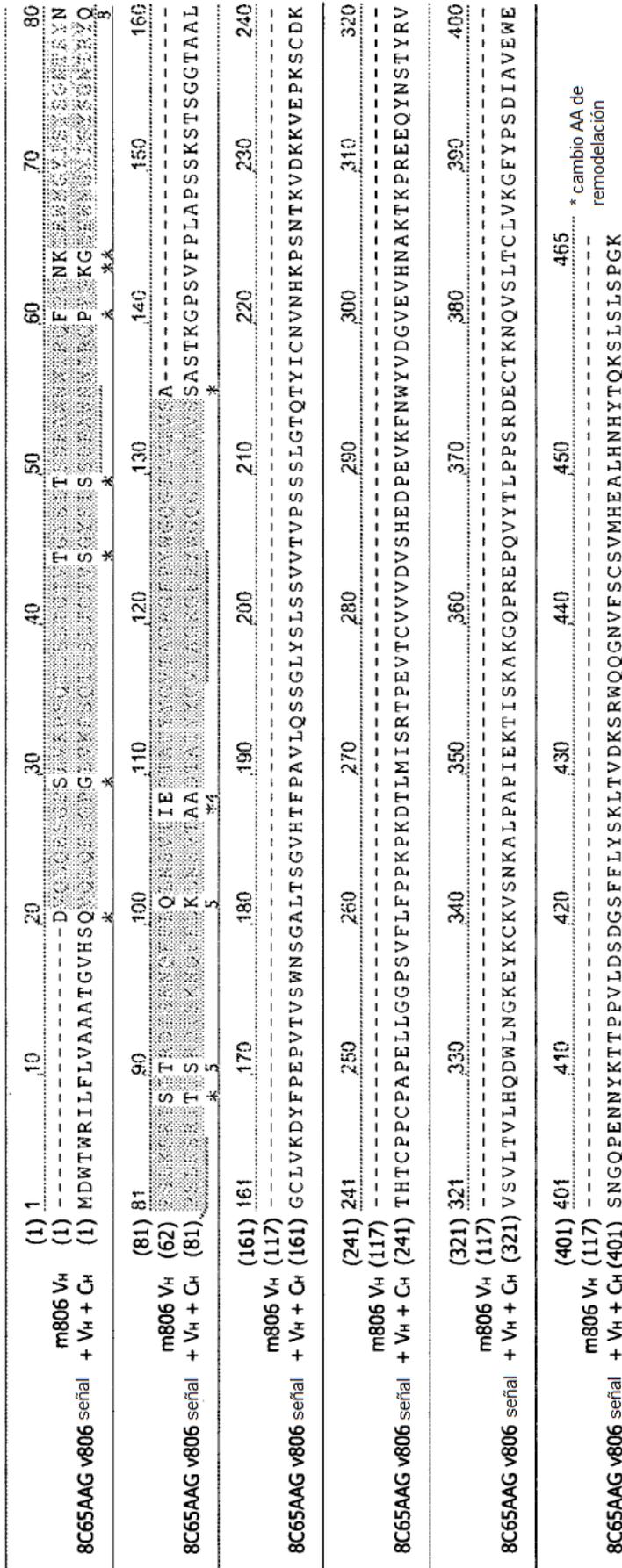
FvuII
HspMI PstI
961 GACCGTGGACAGAGCCAGGTGGCAGCGGCCAAGCTGCTCAGCTGCAGCGGTGATGCAAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTGGCACCTGTTCTCGTCCACCTCTCTCCCGTGGCAACAAGTCGACGTCGGCACTACGTTCT
T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E

1021 GGGCTGACACCAACCACTACACCCAGAGAGCCCTGAGCCCTGTCCCGCCAGGTGTGTAAG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGGGACGTTGTTGGTGTGTGCTCTCTCTCTGACTCGGACAGGGGGCGCTTCACTACTGC
A L H N H Y T Q K S L S L S P G K * *

EagI EcoRI BclI
1081 ACGGGCCCTGCGGACGACCGAATTCATGAGCATTAATCAGCCATACC (SEQ ID NO:80)
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGGCCCCCGACGCCCTGCTGCTTAAGTAACCTAGTATTAGTCCGATATGG

```

FIG.58 (continuación)



* cambio AA de remodelación

FIG.59

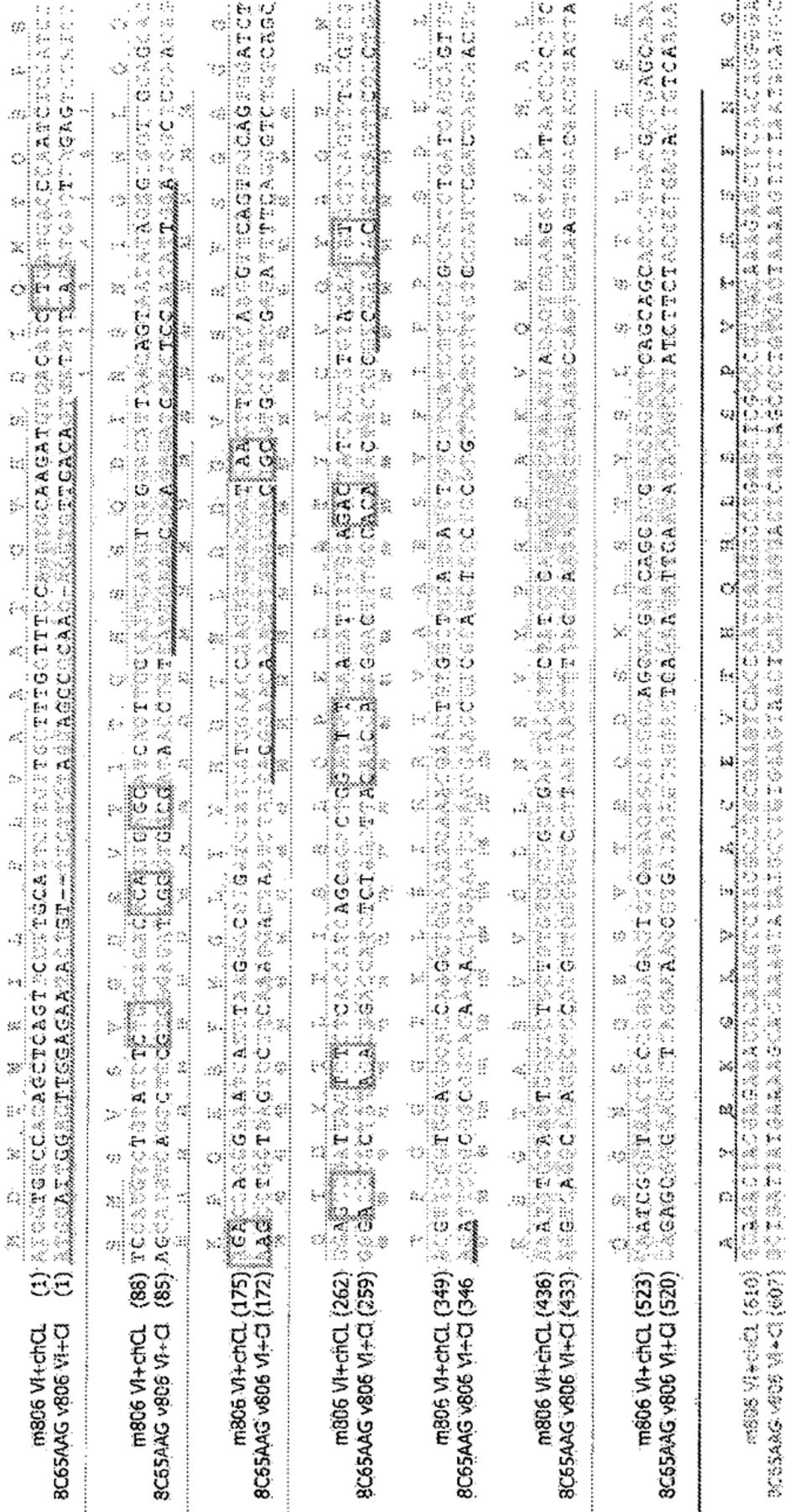
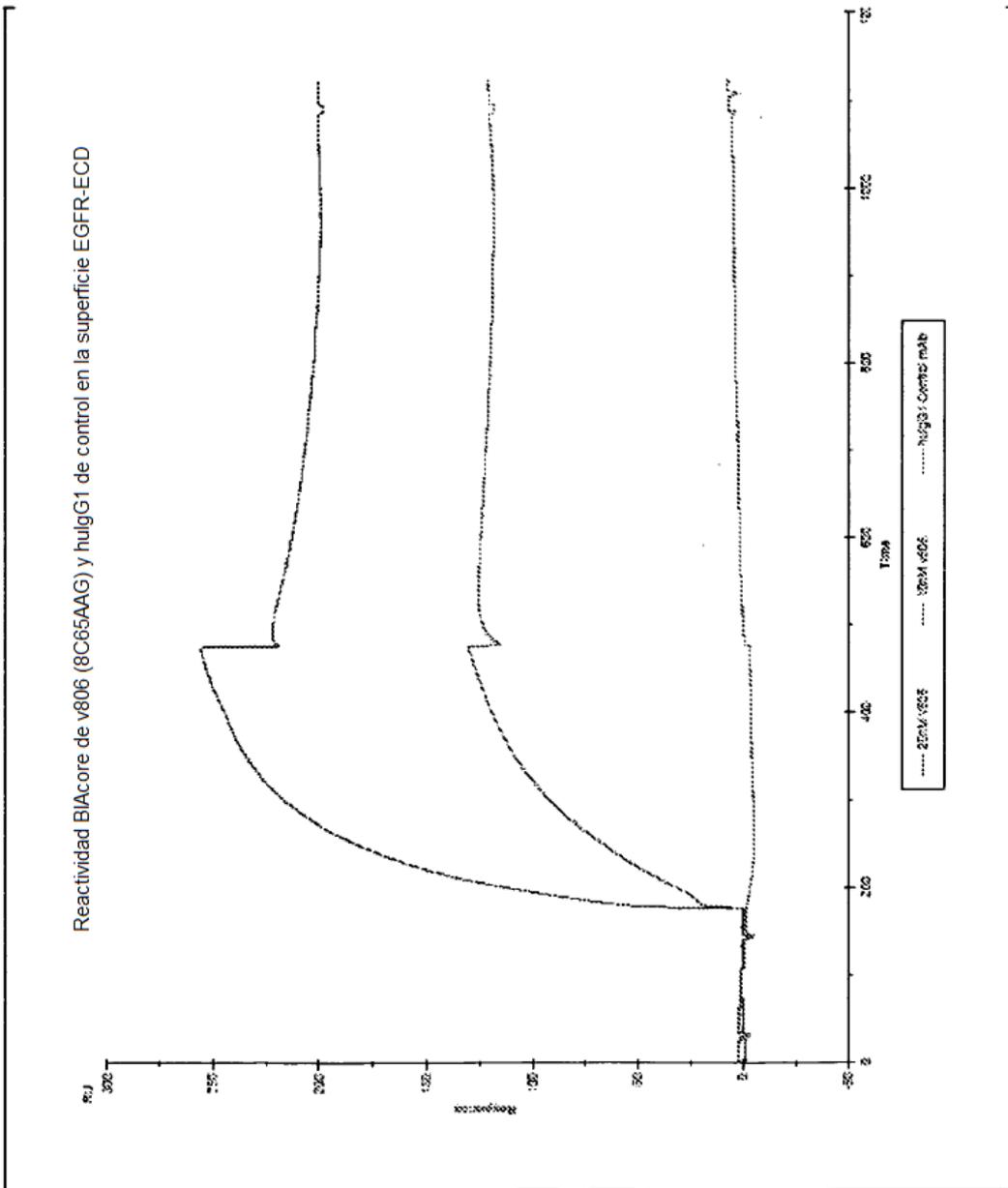


FIG.61

Clave
 [] remodelación: cambio de codón
 --- Secuencia de ADN conservada
 - - - - - Secuencia de ADN cambiada para optimización de codón
 CDR
 _____ Secuencia señal



Demuestra que la unión de anticuerpo hu806 purificado obtenido de células 293 transfectantes transitorias a ECD de EGFR recombinante determinado por Biacore. No se observó unión a ECD de EGFR con anticuerpo IgG1 humano de control purificado.

FIG.63

ES 2 540 802 T3

```

LOCUS
8C65AAG          11891 bp    DNA        circular    27-NOV-2006
      DEFINITION  veneered 806 EC variable region, GeneArt human EC constant
region, veneered LC variable region, cod-opt LC constant region, combined in
large Lonza Vector.
SOURCE
  ORGANISM
COMMENT          This file is created by Vector NTI
                  http://www.invitrogen.com/
COMMENT          VNTDATE|418148572|
COMMENT          VNTDBDATE|428174363|
COMMENT          LSOWNER:
COMMENT          VNTNAME|8C65AAG|
COMMENT          VNTAUTHORNAME|Anne Murray|
COMMENT          VNTAUTHORTEL|646 888-2342|
COMMENT          VNTAUTHORFAX|646 422-0492|
COMMENT          VNTAUTHOREML|murrayai@mskcc.org|
COMMENT          VNTAUTHORAD1|Ludwig Inst. at Memorial Sloan Kettering Cancer Center|
COMMENT          VNTAUTHORAD2|1275 York Ave.|
COMMENT          VNTAUTHORAD3|New York, NY 10021 |
COMMENT          VNTAUTHORAD4|USA|
COMMENT          VNTREPLTYPE|Plasmid
COMMENT          Vector__NTI__Display__Data__(Do__Not__Edit!)
COMMENT          (SXF
COMMENT          (CGexDoc "8C65AAG" 0 11891
COMMENT          (CDBMol 0 0 1 6556 1 0 0 1 0 "" "" 0 0 0 0 (COBList) (COBList)
(COBList)
COMMENT          (COBList) -1 "")
COMMENT          (CDocSetData 1 1 0 0 0 0 "MAIN" 1 1 1 1 0 0 1 1 1 0 10 10 40 50 0
1 0
COMMENT          (CHomObj 0 0 0 3 75) (CWordArray) (CWordArray)
COMMENT          (CStringList "BamHI" "BglII" "DraIII" "FseI" "HindIII" "MluI"
"NotI"
COMMENT          "PacI" "RsrII" "SalI") (CStringList "atg" "gtg")
COMMENT          (CStringList "taa" "tga" "tag") (COBList) 1 "{(0,1),2}" 0 0 "" 0
4294967295 0 1 0 0 0 0 1 "MAIN" 0 0 30 0
COMMENT          (CProteinMotifSearchObject 100 10 1 1 1 1 1 0 1 0 0 0 0 0)
COMMENT          (CMolPar 1 0 0 0 0 1 11891 0 0 0 0 0 0 0 0) (CStringList)
(CCStringList)
COMMENT          (COBList) (COAPar 25 250 50 0 6 4 3 7) (COAPar 25 250 50 0 6 4 3
7)
COMMENT          (COAPar 25 250 50 0 6 4 3 7)
COMMENT          (COBList #0=(CRSite (CStringList) "BamHI" "ggatcc" 2 0 1 5059 0 0
"")
COMMENT          #1=(CRSite (CStringList) "BglII" "agatct" 2 0 1 8910 0 0 "")
COMMENT          #2=(CRSite (CStringList) "DraIII" "cacnngtc" 7 0 2 128 0 543 0 0
"")
COMMENT          #3=(CRSite (CStringList) "FseI" "ggcggcc" 7 0 1 551 0 0 "")
COMMENT          #4=(CRSite (CStringList) "HindIII" "aagctt" 2 0 2 2 0 3869 0 0
"")
COMMENT          #5=(CRSite (CStringList) "MluI" "acgcgt" 2 0 1 9821 0 0 "")
COMMENT          #6=(CRSite (CStringList) "NotI" "gcggccgc" 3 0 1 1878 0 0 "")
COMMENT          #7=(CRSite (CStringList) "PacI" "ttaattaa" 6 0 1 4387 0 0 "")
COMMENT          #8=(CRSite (CStringList) "RsrII" "cggwccg" 3 0 2 3999 0 4377 0 0
"")
"")

```

ES 2 540 802 T3

```

COMMENT      #9=(CRSite (CStringList) "SalI" "gtcgac" 2 0 1 5335 0 0 "")
COMMENT      (COBList
COMMENT      #10=(CFSignal (COBList) "GeneArt HC C-Reg" 2 0 0 553 1643 0
COMMENT      (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #11=(CFSignal (COBList) "SV40 polyA" 25 0 0 1644 1875 0
(CCStringList)
COMMENT      (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #12=(CFSignal (COBList) "Signal (SV40E (and SV40 ori))" 21 0 0
7356 7699
COMMENT      0 (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #13=(CFSignal (COBList) "RNA (beta-lactamase) Amp(R)" 53 0 1 6121
6981 0
COMMENT      (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #14=(CFSignal (COBList) "mRNA (GS cDNA)" 54 0 0 7707 8906 0
COMMENT      (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #15=(CFSignal (COBList) "Promoter (hCMV-MIE)" 30 0 0 9784 10926 0
COMMENT      (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #16=(CFSignal (COBList) "Intron (SV40 intron + poly A)" 15 0 0
8909 9760
COMMENT      0 (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #17=(CFSignal (COBList) "5'UTR_1" 52 0 0 10927 11047 0
(CCStringList)
COMMENT      (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #18=(CFSignal (COBList) "Intron_1" 15 0 0 11048 11874 0
(CCStringList)
COMMENT      (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #19=(CFSignal (COBList) "5'UTR_2" 52 0 0 11875 11891 0
(CCStringList)
COMMENT      (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #20=(CFSignal (COBList) "Heavy Chain 806 V-Region Insert" 45 0 0
128 542
COMMENT      0 (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #21=(CFSignal (COBList) "HtoY" 23 0 0 4315 4315 0 (CStringList)
COMMENT      (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #22=(CFSignal (COBList) "Light-Const. chg 2.1-3" 23 0 0 4716 4716
0
COMMENT      (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #23=(CFSignal (COBList) "Light-Chain 806 V-Region insert" 45 0 0
3999
COMMENT      4376 0 (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #24=(CFSignal (COBList) "Promoter (hCMV-MIE) (from NotI)" 30 0 0
1884
COMMENT      2902 0 (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #25=(CFSignal (COBList) "5'UTR_2" 52 0 0 3851 3867 0
(CCStringList)
COMMENT      (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #26=(CFSignal (COBList) "Intron_1" 15 0 0 3024 3850 0
(CCStringList)
COMMENT      (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #27=(CFSignal (COBList) "5'UTR_1" 52 0 0 2903 3023 0
(CCStringList)
COMMENT      (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #28=(CFSignal (COBList) "SV40 poly A" 25 0 0 4827 5063 0
(CCStringList)
COMMENT      (CStringList) 1 1 1 1 "")
COMMENT      #29=(CFSignal (COBList) "Codon-Optimized Kappa Constant Region" 2

```

FIG.64 (continuación)

ES 2 540 802 T3

```

0 0
COMMENT          4390 4600 0 (CStringList) (CStringList) 1 1 1 1 "")
(CobList)
COMMENT          (CobList) (CobList) (CobList) (CobList) (CobList)
COMMENT          (CTextView 0
COMMENT          #30=(CGroupPar (CParagraph 0 (0 0) 1 2 0 0 180)
COMMENT          (CObjectList
COMMENT          #31=(CRefLinePar
COMMENT          (CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 0 2 0 1 233) "8C65AAG"
2) 5 ""
COMMENT          0 4)
COMMENT          #32=(CFolderPar
COMMENT          (CGroupPar (CParagraph 1 (0 0) 1 1 0 0 178)
COMMENT          (CObjectList
COMMENT          #33=(CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 1 2 1 0 180)
COMMENT          "DNA Plasmid '8C65AAG'" 1)
COMMENT          #34=(CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 1 2 1 0 180)
COMMENT          "venered 806 HC variable region, GeneArt human
HC constant region, venered LC variable region, cod-opt LC constant region,
combined in large Lonza Vector"
COMMENT          1)
COMMENT          #35=(CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 1 2 1 0 180)
COMMENT          "Currently local object. Original author: Anne"
1)
COMMENT          #36=(CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 1 2 1 0 180)
COMMENT          "Created: 08/07/06 04:22PM" 1)
COMMENT          #37=(CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 1 2 1 0 180)
COMMENT          "Last Modified: 11/27/06 05:19PM" 1)
COMMENT          #38=(CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 1 2 1 0 180)
COMMENT          "length: 11891 bp" 1)
COMMENT          #39=(CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 1 2 1 0 180)
COMMENT          "storage type: Basic" 1)
COMMENT          #40=(CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 1 2 1 0 180)
COMMENT          "form: Circular" 1))) "General Description")
COMMENT          #41=(CFolderPar
COMMENT          (CGroupPar (CParagraph 2 (0 0) 1 1 0 0 178)
COMMENT          (CObjectList))
COMMENT          "Standard Fields")
COMMENT          #42=(CFolderPar
COMMENT          (CGroupPar (CParagraph 5 (0 0) 1 1 0 0 178)
COMMENT          (CObjectList
COMMENT          #43=(CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 1 2 1 0 180)
COMMENT          "Anne" 1)))
COMMENT          "Original Author")
COMMENT          #44=(CRefLinePar
COMMENT          (CLinePar (CParagraph 0 (0 0) 0 2 0 0 233) "Comments"
2) 1 ""
COMMENT          0 0)
COMMENT          #45=(CFolderPar
COMMENT          (CGroupPar (CParagraph 8 (0 0) 1 2 0 0 178)
COMMENT          (CObjectList))
COMMENT          "Annotations")
COMMENT          #46=(CFolderPar
COMMENT          (CGroupPar (CParagraph 12 (6 0) 1 1 0 0 178)
COMMENT          (CObjectList
COMMENT          #47=(CFolderPar

```

FIG.64 (continuación)

```

COMMENT      (CGroupPar (CParagraph 2 (7 2 0) 1 1 1 0 178)
COMMENT      (CObjectList
COMMENT      #48=(CFolderPar
COMMENT      (CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 553 (3 #10# 0) 1 2 2 0 194)
COMMENT      (CObjectList
COMMENT      #49=(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Start: 553 End: 1643" 1))
COMMENT      #50=(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "GeneArt human HC C-Reg" 1)))
COMMENT      "GeneArt HC C-Reg")
COMMENT      #51=(CFolderPar
COMMENT      (CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 4390 (3 #29# 0) 1 2 2 0
COMMENT      194)
COMMENT      (CObjectList
COMMENT      #52=(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Start: 4390 End: 4800" 1)))
COMMENT      "Codon-Optimized Kappa Constant
COMMENT      Region"))))
COMMENT      "C-Region (2 total)")
COMMENT      #53=(CFolderPar
COMMENT      (CGroupPar (CParagraph 15 (7 15 0) 1 1 1 0 178)
COMMENT      (CObjectList
COMMENT      #54=(CFolderPar
COMMENT      (CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 3024 (3 #26# 0) 1 2 2 0
COMMENT      194)
COMMENT      (CObjectList
COMMENT      #55=(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Start: 3024 End: 3850" 1)
COMMENT      #56=(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "intron" 1))) "Intron_1")
COMMENT      #57=(CFolderPar
COMMENT      (CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 8909 (3 #16# 0) 1 2 2 0
COMMENT      194)
COMMENT      (CObjectList
COMMENT      #58=(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Start: 8909 End: 9760" 1)
COMMENT      #59=(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "SV40 intron + poly A" 1)))
COMMENT      "Intron (SV40 intron + poly A)")
COMMENT      #60=(CFolderPar
COMMENT      (CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 11048 (3 #18# 0) 1 2 2 0
COMMENT      194)
COMMENT      (CObjectList
COMMENT      #61=(CLinePar

```

FIG.64 (continuación)

ES 2 540 802 T3

```

COMMENT          (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT          "Start: 11048 End: 11874" 1)
COMMENT          #62=(CLinePar
COMMENT          (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT          "intron" 1))) "Intron_1"))
COMMENT          "Intron (3 total)")
COMMENT          #63=(CFolderPar
COMMENT          (CGroupPar (CParagraph 21 (7 21 0) 1 1 1 0 178)
COMMENT          (CObjectList
COMMENT          #64=(CFolderPar
COMMENT          (CGroupPar
COMMENT          (CParagraph 7356 (3 #12# 0) 1 2 2 0
COMMENT          194)
COMMENT          (CObjectList
COMMENT          #65=(CLinePar
COMMENT          (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT          "Start: 7356 End: 7699" 1)
COMMENT          #66=(CLinePar
COMMENT          (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT          "SV40E (and SV40 ori)" 1)))
COMMENT          "Signal (SV40E (and SV40 ori);)")
COMMENT          "Misc. Feature (1 total)")
COMMENT          #67=(CFolderPar
COMMENT          (CGroupPar (CParagraph 23 (7 23 0) 1 1 1 0 178)
COMMENT          (CObjectList
COMMENT          #68=(CFolderPar
COMMENT          (CGroupPar
COMMENT          (CParagraph 4315 (3 #21# 0) 1 2 2 0
COMMENT          194)
COMMENT          (CObjectList
COMMENT          #69=(CLinePar
COMMENT          (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT          "Start: 4315 End: 4315" 1)
COMMENT          #70=(CLinePar
COMMENT          (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT          "Histidine-to-Tyrosine change in
the 806 Light-Chain variable CDR3 region"
COMMENT          1))) "HtoY")
COMMENT          #71=(CFolderPar
COMMENT          (CGroupPar
COMMENT          (CParagraph 4716 (3 #22# 0) 1 2 2 0
COMMENT          194)
COMMENT          (CObjectList
COMMENT          #72=(CLinePar
COMMENT          (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT          "Start: 4716 End: 4716" 1)
COMMENT          #73=(CLinePar
COMMENT          (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT          "Light-chain c-region change 2.1-
3" 1)))
COMMENT          "Light-Const. chg 2.1-3"))
COMMENT          "Modified Base (2 total)")
COMMENT          #74=(CFolderPar
COMMENT          (CGroupPar (CParagraph 25 (7 25 0) 1 1 1 0 178)
COMMENT          (CObjectList
COMMENT          #75=(CFolderPar

```

FIG.64 (continuación)

```

COMMENT                                (CGroupPar
COMMENT                                (CParagraph 1644 (3 #11# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #76=(CLinePar
COMMENT                                (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                "Start: 1644 End: 1875" 1)))
COMMENT                                "SV40 polyA")
COMMENT                                #77=(CFolderPar
COMMENT                                (CGroupPar
COMMENT                                (CParagraph 4827 (3 #28# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #78=(CLinePar
COMMENT                                (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                "Start: 4827 End: 5063" 1)
COMMENT                                #79=(CLinePar
COMMENT                                (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT                                "SV40 poly A" 1))) "SV40 poly
A" )))
COMMENT                                "PolyA Signal (2 total)")
#80=(CFolderPar
(CGroupPar (CParagraph 30 (7 30 0) 1 1 1 0 178)
(CObjectList
#81=(CFolderPar
(CGroupPar
(CParagraph 1884 (3 #24# 0) 1 2 2 0
194)
(CObjectList
#82=(CLinePar
(CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
"Start: 1884 End: 2902" 1)
#83=(CLinePar
(CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
"Promoter (hCMV-MIE) (from NotI)"
1)))
"Promoter (hCMV-MIE) (from NotI)")
#84=(CFolderPar
(CGroupPar
(CParagraph 9784 (3 #15# 0) 1 2 2 0
194)
(CObjectList
#85=(CLinePar
(CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
"Start: 9784 End: 10926" 1)
#86=(CLinePar
(CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
"hCMV-MIE promoter" 1)))
"Promoter (hCMV-MIE)"))
"Promoter Prokaryotic (2 total)")
#87=(CFolderPar
(CGroupPar (CParagraph 45 (7 45 0) 1 1 1 0 178)
(CObjectList
#88=(CFolderPar
(CGroupPar
(CParagraph 128 (3 #20# 0) 1 2 2 0 194)

```

FIG.64 (continuación)

```

COMMENT      (CObjectList
COMMENT      #89=(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Start: 128 End: 542 " 1)))
COMMENT      "Heavy Chain 806 V-Region Insert")
COMMENT      #90=(CFolderPar
COMMENT      (CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 3999 (3 #23# 0) 1 2 2 0
COMMENT      194)
COMMENT      (CObjectList
COMMENT      #91=(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Start: 3999 End: 4376" 1)))
COMMENT      "Light-Chain 806 V-Region insert"))
COMMENT      "V-Region (2 total)")
COMMENT      #92=(CFolderPar
COMMENT      (CGroupPar (CParagraph 52 (7 52 0) 1 1 1 0 178)
COMMENT      (CObjectList
COMMENT      #93=(CFolderPar
COMMENT      (CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 2903 (3 #27# 0) 1 2 2 0
COMMENT      194)
COMMENT      (CObjectList
COMMENT      #94=(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Start: 2903 End: 3023" 1)
COMMENT      #95=(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      1))) "5'UTR_1")
COMMENT      #96=(CFolderPar
COMMENT      (CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 3851 (3 #25# 0) 1 2 2 0
COMMENT      194)
COMMENT      (CObjectList
COMMENT      #97=(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Start: 3851 End: 3867" 1)
COMMENT      #98=(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      1))) "5'UTR_2")
COMMENT      #99=(CFolderPar
COMMENT      (CGroupPar
COMMENT      (CParagraph 10927 (3 #17# 0) 1 2 2 0
COMMENT      194)
COMMENT      (CObjectList
COMMENT      #100=(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      "Start: 10927 End: 11047" 1)
COMMENT      #101=(CLinePar
COMMENT      (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0 180)
COMMENT      1))) "5'UTR_1")
COMMENT      #102=(CFolderPar
COMMENT      (CGroupPar

```

FIG.64 (continuación)

```

COMMENT                                     (CParagraph 11875 (3 #19# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                                     (CObjectList
COMMENT                                     #103=(CLinePar
COMMENT                                     (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0
180)
COMMENT                                     "Start: 11875 End: 11891" 1)
COMMENT                                     #104=(CLinePar
COMMENT                                     (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0
180)
COMMENT                                     "5'UT" 1))) "5'UTR_2"))
COMMENT                                     "5' UTR (4 total)")
COMMENT                                     #105=(CFolderPar
COMMENT                                     (CGroupPar (CParagraph 53 (7 53 0) 1 1 1 0
178)
COMMENT                                     (CObjectList
COMMENT                                     #106=(CFolderPar
COMMENT                                     (CGroupPar
COMMENT                                     (CParagraph 6121 (3 #13# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                                     (CObjectList
COMMENT                                     #107=(CLinePar
COMMENT                                     (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0
180)
COMMENT                                     "Start: 6121 End: 6981
(Complementary)"
COMMENT                                     1)
COMMENT                                     #108=(CLinePar
COMMENT                                     (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0
180)
COMMENT                                     "beta-lactamase" 1)))
COMMENT                                     "RNA (beta-lactamase) Amp(R)")
COMMENT                                     "RNA - Misc. (1 total)")
COMMENT                                     #109=(CFolderPar
COMMENT                                     (CGroupPar (CParagraph 54 (7 54 0) 1 1 1 0
178)
COMMENT                                     (CObjectList
COMMENT                                     #110=(CFolderPar
COMMENT                                     (CGroupPar
COMMENT                                     (CParagraph 7707 (3 #14# 0) 1 2 2 0
194)
COMMENT                                     (CObjectList
COMMENT                                     #111=(CLinePar
COMMENT                                     (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0
180)
COMMENT                                     "Start: 7707 End: 8906" 1)
COMMENT                                     #112=(CLinePar
COMMENT                                     (CParagraph 0 (0 0) 1 2 3 0
180)
COMMENT                                     "GS cDNA" 1))) "mRNA (GS
cDNA)"))
COMMENT                                     "mRNA (1 total)")) "Feature Map")
COMMENT                                     #113=(CFolderPar
COMMENT                                     (CGroupPar (CParagraph 13 (0 0) 1 1 0 0 178)
COMMENT                                     (CObjectList
COMMENT                                     #114=(CRSFolderPar

```

FIG.64 (continuación)

```

COMMENT                                (CFolderPar
COMMENT                                (CGroupPar (CParagraph 37104496 (8 0) 1 1 1
0 178)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #115=(CGroupPar
COMMENT                                (CParagraph 0 (10 #0# 0) 1 2 2 0
180)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #116=(CLinePar
COMMENT                                (CParagraph 0 (1 #0# 1) 1 2 2
0 191)
COMMENT                                " N1: 5059 " 1)))) "BamHI: 1
COMMENT                                site")
COMMENT                                1 5 "GGATCC" "CCTAGG")
COMMENT                                #117=(CRSFolderPar
COMMENT                                (CFolderPar
COMMENT                                (CGroupPar (CParagraph 37104336 (8 0) 1 1 1
0 178)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #118=(CGroupPar
COMMENT                                (CParagraph 0 (10 #1# 0) 1 2 2 0
180)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #119=(CLinePar
COMMENT                                (CParagraph 0 (1 #1# 1) 1 2 2
0 191)
COMMENT                                " N1: 8910 " 1)))) "BglIII: 1
COMMENT                                site")
COMMENT                                1 5 "AGATCT" "TCTAGA")
COMMENT                                #120=(CRSFolderPar
COMMENT                                (CFolderPar
COMMENT                                (CGroupPar (CParagraph 18147408 (8 0) 1 1 1
0 178)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #121=(CGroupPar
COMMENT                                (CParagraph 0 (10 #2# 0) 1 2 2 0
180)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #122=(CLinePar
COMMENT                                (CParagraph 0 (1 #2# 1) 1 2 2
0 191)
COMMENT                                " N1: 128 " 1)
COMMENT                                #123=(CLinePar
COMMENT                                (CParagraph 0 (1 #2# 2) 1 2 2
0 191)
COMMENT                                " N2: 543 " 1)))) "DraIII: 2
COMMENT                                sites")
COMMENT                                6 3 "CACNNNGTG" "GTGNNNCAC")
COMMENT                                #124=(CRSFolderPar
COMMENT                                (CFolderPar
COMMENT                                (CGroupPar (CParagraph 37104736 (8 0) 1 1 1
0 178)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #125=(CGroupPar
COMMENT                                (CParagraph 0 (10 #3# 0) 1 2 2 0
180)

```

FIG.64 (continuación)

```

COMMENT                                (ObjectList
COMMENT                                #126=(CLinePar
COMMENT                                (CParagraph 0 (1 #3# 1) 1 2 2
0 191)
COMMENT                                " N1: 551 " 1)))) "FseI: 1
site") 6
COMMENT                                2 "GGCCGCC" "CGGCCGG")
COMMENT                                #127=(CRSFoldPar
COMMENT                                (CFolderPar
COMMENT                                (CGroupPar (CParagraph 37104576 (8 0) 1 1 1
0 178)
COMMENT                                (ObjectList
COMMENT                                #128=(CGroupPar
COMMENT                                (CParagraph 0 (10 #4# 0) 1 2 2 0
180)
COMMENT                                (ObjectList
COMMENT                                #129=(CLinePar
COMMENT                                (CParagraph 0 (1 #4# 1) 1 2 2
0 191)
COMMENT                                " N1: 2 " 1)
COMMENT                                #130=(CLinePar
COMMENT                                (CParagraph 0 (1 #4# 2) 1 2 2
0 191)
COMMENT                                " N2: 3869 " 1))))
COMMENT                                "HindIII: 2 sites") 1 5 "AAGCTT" "TTCGAA")
COMMENT                                #131=(CRSFoldPar
COMMENT                                (CFolderPar
COMMENT                                (CGroupPar (CParagraph 27521208 (8 0) 1 1 1
0 178)
COMMENT                                (ObjectList
COMMENT                                #132=(CGroupPar
COMMENT                                (CParagraph 0 (10 #5# 0) 1 2 2 0
180)
COMMENT                                (ObjectList
COMMENT                                #133=(CLinePar
COMMENT                                (CParagraph 0 (1 #5# 1) 1 2 2
0 191)
COMMENT                                " N1: 9821 " 1)))) "MiuI: 1
site")
COMMENT                                1 5 "ACGCGT" "TGGCA")
COMMENT                                #134=(CRSFoldPar
COMMENT                                (CFolderPar
COMMENT                                (CGroupPar (CParagraph 37104976 (8 0) 1 1 1
0 178)
COMMENT                                (ObjectList
COMMENT                                #135=(CGroupPar
COMMENT                                (CParagraph 0 (10 #6# 0) 1 2 2 0
180)
COMMENT                                (ObjectList
COMMENT                                #136=(CLinePar
COMMENT                                (CParagraph 0 (1 #6# 1) 1 2 2
0 191)
COMMENT                                " N1: 1878 " 1)))) "NotI: 1
site")
COMMENT                                2 6 "GCGCCGC" "CGCCGCG")
COMMENT                                #137=(CRSFoldPar

```

FIG.64 (continuación)

```

COMMENT                                (CFolderPar
COMMENT                                (CGroupPar (CParagraph 37104815 (8 0) 1 1 1
0 178)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #138=(CGroupPar
COMMENT                                (CParagraph 0 (10 #7# 0) 1 2 2 0
180)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #139=(CLinePar
COMMENT                                (CParagraph 0 (1 #7# 1) 1 2 2
0 191)
COMMENT                                " N1: 4387 " 1)))) "PacI: 1
COMMENT                                site")
COMMENT                                5 3 "TTAATTAA" "AATTAATT")
COMMENT                                #140=(CRSFolderPar
COMMENT                                (CFolderPar
COMMENT                                (CGroupPar (CParagraph 37104255 (8 0) 1 1 1
0 178)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #141=(CGroupPar
COMMENT                                (CParagraph 0 (10 #8# 0) 1 2 2 0
180)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #142=(CLinePar
COMMENT                                (CParagraph 0 (1 #8# 1) 1 2 2
0 191)
COMMENT                                " N1: 3999 " 1)
COMMENT                                #143=(CLinePar
COMMENT                                (CParagraph 0 (1 #8# 2) 1 2 2
0 191)
COMMENT                                " N2: 4377 " 1)))) "RsrII: 2
COMMENT                                sites")
COMMENT                                2 5 "CGWCCG" "GCCWGGC")
COMMENT                                #144=(CRSFolderPar
COMMENT                                (CFolderPar
COMMENT                                (CGroupPar (CParagraph 18147328 (8 0) 1 1 1
0 178)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #145=(CGroupPar
COMMENT                                (CParagraph 0 (10 #9# 0) 1 2 2 0
180)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #146=(CLinePar
COMMENT                                (CParagraph 0 (1 #9# 1) 1 2 2
0 191)
COMMENT                                " N1: 5335 " 1)))) "SalI: 1
COMMENT                                site")
COMMENT                                1 5 "GTCGAC" "CAGCTG"))
COMMENT                                "Restriction/Methylation Map"))))
COMMENT                                (CGraphView
COMMENT                                (CWStyleSheet
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #147=(CWidgetStyle "RSite Label" 1 (LOGPEN 0 0 13408563) 1 0 1
COMMENT                                (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 3 2 1 18 "Georgia") 0.555556
0 1 5
COMMENT                                "@N (@S)" 0)

```

FIG.64 (continuación)

ES 2 540 802 T3

```

COMMENT      #148=(CWidgetStyle "Signal Label" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 0 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.666667 0
1 1
COMMENT      "@N" 0)
COMMENT      #149=(CWidgetStyle "Molecule Label 2" 0 0 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 18 "Georgia") 0.555556
0 1 16
COMMENT      "@L bp" 0)
COMMENT      #150=(CWidgetStyle "Molecule Label 1" 0 0 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 34 "Verdana") 0.833333
0 1 1
COMMENT      "@N" 0)
COMMENT      #151=(CWidgetStyle "Shape 3" 1 (LOGPEN 0 0 3355545) 1 1
COMMENT      (LOGBRUSH 0 6724095 0) 0 0 1 (LOGSHAPE 9 1 0.8 1.8 0))
COMMENT      #152=(CWidgetStyle "Shape 1" 1 (LOGPEN 0 0 6723840) 1 1
COMMENT      (LOGBRUSH 0 10079334 0) 0 0 1 (LOGSHAPE 9 1 0.8 1.8 0))
COMMENT      #153=(CWidgetStyle "Axis" 1 (LOGPEN 0 0 10079436) 2 1
COMMENT      (LOGBRUSH 0 13434879 0) 0 0 1 (LOGSHAPE 10 1 0 0 0))
COMMENT      #154=(CWidgetStyle "Line 2" 1 (LOGPEN 0 0 6723840) 8 0 0 0 1
COMMENT      (LOGSHAPE 1 1.9 0 0 0))
COMMENT      #155=(CWidgetStyle "RSite" 1 (LOGPEN 0 0 10053171) 8 0 0 0 1
COMMENT      (LOGSHAPE 1 1.9 0 0 0))
COMMENT      #156=(CWidgetStyle "Short Signal" 1 (LOGPEN 0 0 13395507) 10 0
0 0 1
COMMENT      (LOGSHAPE 1 1.9 0 0 0))
COMMENT      #157=(CWidgetStyle "Uniq RSite Label" 1 (LOGPEN 0 0 153) 1 0 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 18 "Georgia") 0.555556
128 1
COMMENT      5 "@N (@S)" 0)
COMMENT      #158=(CWidgetStyle "Vanilla" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 1
COMMENT      (LOGBRUSH 0 16777215 0) 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 7 48 2 18 "Times New Roman")
0.8 0
COMMENT      1 2 "?" 0)
COMMENT      #159=(CWidgetStyle "Mark 1" 0 0 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 2 7 48 2 2 "Windings") 0.7 0 1
2 "?"
COMMENT      0)
COMMENT      #160=(CWidgetStyle "Motif Label" 1 (LOGPEN 0 0 16744512) 1 0 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.611111
8388608
COMMENT      1 65535 "@N (@R)" 0)
COMMENT      #161=(CWidgetStyle "Fragment Label 2" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 0 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 49 "Courier New") 1.05
0 1 48
COMMENT      "@F bp (molecule @L bp)" 0)
COMMENT      #162=(CWidgetStyle "Fragment Label 1" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 0 1
COMMENT      (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.91 0 1 1
COMMENT      "Fragment of @N" 0)
COMMENT      #163=(CWidgetStyle "Shape 4" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 1
COMMENT      (LOGBRUSH 2 8388608 5) 0 0 0)
COMMENT      #164=(CWidgetStyle "Shape 2" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 1 (LOGBRUSH 0
128 0) 0
COMMENT      0 0)
COMMENT      #165=(CWidgetStyle "Shape 0" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 1 (LOGBRUSH 0 0
0) 0 0

```

FIG.64(continuación)

```

COMMENT          0)
COMMENT          #166=(CWidgetStyle "ORF" 1 (LOGPEN 0 0 16384) 8 0 0 0 1
COMMENT          (LOGSHAPE 7 0.2 3.41182 2.86186 0.609808))
COMMENT          #167=(CWidgetStyle "Line 4" 1 (LOGPEN 0 0 32768) 8 0 0 0 0)
COMMENT          #168=(CWidgetStyle "Line 3" 1 (LOGPEN 0 0 16711680) 8 0 0 0 0)
COMMENT          #169=(CWidgetStyle "Line 1" 1 (LOGPEN 0 0 16711680) 1 0 0 0 0)
COMMENT          #170=(CWidgetStyle "Short Promoter" 1 (LOGPEN 0 0 128) 6 0 0 0
0)
COMMENT          #171=(CWidgetStyle "Motif" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 0 0 0 0)
COMMENT          #172=(CWidgetStyle "Line 0" 1 (LOGPEN 0 0 0) 8 0 0 0 0)
COMMENT          #173=(CWidgetStyle "Void" 0 0 0 0 0)
COMMENT          #174=(CWidgetStyle "General Label" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 0 1
COMMENT          (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 18 "Times New Roman")
0.91 0
COMMENT          1 3 "@T @N " 0)
COMMENT          #175=(CWidgetStyle "Position" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 0 0 0 0)
COMMENT          #176=(CWidgetStyle "Annotation" 0 0 1
COMMENT          (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 18 "Times New Roman")
0.91 0
COMMENT          0 0)
COMMENT          #177=(CWidgetStyle "Position Label" 1 (LOGPEN 0 0 8388608) 1 0
1
COMMENT          (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 1 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.63
8388608 1 1
COMMENT          "@N" 0)
COMMENT          #178=(CWidgetStyle "Range" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 1
COMMENT          (LOGBRUSH 0 16777215 0) 0 0 0)
COMMENT          #179=(CWidgetStyle "Range Label" 1 (LOGPEN 0 0 8388608) 1 0 1
COMMENT          (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 1 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.63
8388608 1 1
COMMENT          "@N" 0)
COMMENT          #180=(CWidgetStyle "ORF Label" 1 (LOGPEN 0 0 49216) 1 0 1
COMMENT          (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 18 "Times New Roman")
COMMENT          0.611111 0 1 65535 "@N" 0)
COMMENT          #181=(CWidgetStyle "CDS Label" 1 (LOGPEN 0 0 4227264) 1 0 1
COMMENT          (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.555556
255 1 1
COMMENT          "@N" 0)
COMMENT          #182=(CWidgetStyle "Shape 5" 1 (LOGPEN 0 0 0) 3 1
COMMENT          (LOGBRUSH 0 16777113 0) 1
COMMENT          (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 7 48 2 50 "Arial") 0.9 0 0 1
COMMENT          (LOGSHAPE 9 1 0.8 1.8 0))
COMMENT          #183=(CWidgetStyle "CDS" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 1 (LOGBRUSH 2 39423
3) 0 0
COMMENT          1 (LOGSHAPE 9 1 0.8 1.8 0))
COMMENT          #184=(CWidgetStyle "Label 2" 1 (LOGPEN 0 0 4227264) 1 0 1
COMMENT          (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.944444
8388608
COMMENT          1 1 "@N" 0)
COMMENT          #185=(CWidgetStyle "Label 3" 1 (LOGPEN 0 0 8421376) 1 0 1
COMMENT          (LOGFONT 0 0 0 0 700 255 0 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.833333
255 1
COMMENT          5 "@N (@S)" 0)
COMMENT          #186=(CWidgetStyle "Label 4" 1 (LOGPEN 0 0 8437824) 1 0 1
COMMENT          (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 34 "Arial") 0.722222 0
1 5

```

FIG.64 (continuación)

```

COMMENT          "@N (@S)" 0)
COMMENT          #187=(CWidgetStyle "Shape 6" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 1
COMMENT          (LOGBRUSH 0 3394713 0) 1
COMMENT          (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 7 48 2 50 "Arial") 0.9 0 0
0)
COMMENT          #188=(CWidgetStyle "Shape 7" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 1
COMMENT          (LOGBRUSH 0 3407871 0) 1
COMMENT          (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 7 48 2 50 "Arial") 0.9 0 0
0)
COMMENT          #189=(CWidgetStyle "Shape 8" 1 (LOGPEN 0 0 52275) 1 1
COMMENT          (LOGBRUSH 0 3407871 0) 1
COMMENT          (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 7 48 2 50 "Arial") 0.9 0 0
0)
COMMENT          #190=(CWidgetStyle "Shape 9" 1 (LOGPEN 0 0 0) 1 1
COMMENT          (LOGBRUSH 0 10040064 0) 1
COMMENT          (LOGFONT 0 0 0 0 400 0 0 0 0 7 48 2 50 "Arial") 0.9 0 0
0))
COMMENT          0.164644 1.74233 0.164644 2.53336
COMMENT          (2 (CShapeMapEntry 0 "Shape 9" 1 "Signal Label") 45
COMMENT          (CShapeMapEntry 0 "Shape 8" 1 "Signal Label") 70
COMMENT          (CShapeMapEntry 0 "Unique RSite" 1 "Uniq RSite Label") 67
COMMENT          (CShapeMapEntry 0 "ORF" 0 "ORF Label")) 40.0378 40.0378 39 39
0.1
COMMENT          -11891) 1 0 1 1 1
COMMENT          (mapper: 26.6862 -31.9823 39 39 0.01 10 14 11891 11891 1 0 0)
COMMENT          #191=(CGroupWidget (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 Nil -317 100)
COMMENT          (CObjectList
COMMENT          #192=(CGroupWidget (CWidget 1 (0 0) 1 2 0 0 Nil -639 100)
COMMENT          (CObjectList
COMMENT          #193=(CAXis
COMMENT          (CWideLine
COMMENT          (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #153# 37106252 0)
COMMENT          (LOGPEN 0 0 10079436) 2 (LOGBRUSH 0 13434879
0) 1
COMMENT          6.27471 6.27271 1 0.0214037) 0.0527557)
COMMENT          #194=(CLabel
COMMENT          (CWidget 1001 (0 0) 1 2 0 0 #150# 28370780
100)
COMMENT          (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT          (LOGFONT 41 15 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 34
"Verdana")
COMMENT          2.53336 0.833333 0 "8C65AAG" "@N" 1 0 0.5 0 -
6.206
COMMENT          3.84615 1.07692 Nil)
COMMENT          #195=(CLabel (CWidget 1002 (0 0) 1 2 0 0 #149# 0
100)
COMMENT          (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT          (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1 18
"Georgia")
COMMENT          2.53336 0.555556 0 "11891 bp" "@L bp" 16 0 -
0.8 0
COMMENT          -7.47268 2.30769 0.692308 Nil))
(CObjectList))
COMMENT          #196=(CGroupWidget (CWidget 10 (6 0) 1 2 0 0 Nil 393219
100)
COMMENT          (CObjectList

```

FIG.64 (continuación)

```

COMMENT                               #197=(CGroupWidget
COMMENT                               (CWidget 2 (7 2 0) 1 2 0 0 Nil -108 100)
COMMENT                               (CObjectList
COMMENT                               #198=(CWideArrow
COMMENT                               (CWideLine
COMMENT                               (CWidget 0 (3 #10# 0) 1 2 0 0 #190# 0
100)
COMMENT                               (LOGPEN 0 0 0) 1 (LOGBRUSH 0 10040064
0) 1
COMMENT                               5.40641 5.98197 1 0.082322) 0.8 1.8
0)
COMMENT                               #199=(CLabel
COMMENT                               (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
37745700 100)
COMMENT                               (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                               (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                               "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT                               "GeneArt HC C-Reg" "@N" 1 0 0 -15.0455
COMMENT                               8.30913 6.28205 0.846154 #198#)
COMMENT                               #200=(CWideArrow
COMMENT                               (CWideLine
COMMENT                               (CWidget 0 (3 #29# 0) 1 2 0 0 #190#
393235
COMMENT                               100) (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                               (LOGBRUSH 0 10040064 0) 1 3.74091
3.95774 1
COMMENT                               0.082322) 0.8 1.8 0)
COMMENT                               #201=(CLabel
COMMENT                               (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
28396148 100)
COMMENT                               (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                               (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                               "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT                               "Codon-Optimized Kappa Constant
Region" "@N"
COMMENT                               1 0 0 -11.1884 24.776 14.4872 0.846154
#200#))
COMMENT                               (CObjectList))
COMMENT                               #202=(CGroupWidget
COMMENT                               (CWidget 15 (7 15 0) 1 2 0 0 Nil 18088376
100)
COMMENT                               (CObjectList
COMMENT                               #203=(CLine
COMMENT                               (CWidget 0 (3 #16# 0) 1 2 0 0 #169#
18088384
COMMENT                               100) (LOGPEN 0 0 16711680) 1 0.835356
COMMENT                               1.12422 1.5737)
COMMENT                               #204=(CLabel
COMMENT                               (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
18088512 100)
COMMENT                               (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                               (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                               "Arial") 2.53336 0.666667 0

```

FIG.64 (continuación)

ES 2 540 802 T3

```

COMMENT                                "Intron (SV40 intron + poly A)" "@N" 1
0 0
COMMENT                                13.1146 8.30913 9.74359 0.846154
#203#)
COMMENT                                #205=(CLine
COMMENT                                (CWidget 0 (3 #18# 0) 1 2 0 0 #169# -
1215 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 16711680) 1 0.835356
0.00896848
COMMENT                                0.445258)
COMMENT                                #206=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
27471448 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                "Arial") 2.53336 0.666667 0 "Intron
1" "@N"
COMMENT                                1 0 0 14.7731 3.24241 2.74359 0.846154
#205#)
COMMENT                                #207=(CLine
COMMENT                                (CWidget 0 (3 #26# 0) 1 2 0 0 #169#
268634520
COMMENT                                100) (LOGPEN 0 0 16711680) 1 0.835356
COMMENT                                4.24209 4.67838)
COMMENT                                #208=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
37615420 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                "Arial") 2.53336 0.666667 0 "Intron
1" "@N"
COMMENT                                1 0 0 -7.95233 14.6425 2.74359
0.846154 #207#))
COMMENT                                (CObjectList))
COMMENT                                #209=(CGroupWidget
COMMENT                                (CWidget 21 (7 21 0) 1 2 0 0 Nil 327683 100)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #210=(CWideArrow
COMMENT                                (CWideLine
COMMENT                                (CWidget 0 (3 #12# 0) 1 2 0 0 #152# 0
100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 6723840) 1
COMMENT                                (LOGBRUSH 0 10079334 0) 1 2.21152
2.393 1
COMMENT                                0.082322) 0.6 1.8 0)
COMMENT                                #211=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
18088608 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT                                "Signal (SV40E (and SV40 ori))" "@N" 1
0 0

```

FIG.64 (continuación)

```

COMMENT                                8.88505 12.1092 10.0513 0.846154
#210#))
COMMENT                                (ObjectList))
COMMENT                                #212=(CGroupWidget
COMMENT                                (CWidget 23 (7 23 0) 1 2 0 0 Nil 27956056
100)
COMMENT                                (ObjectList
COMMENT                                #213=(CShape
COMMENT                                (CWidget 0 (3 #21# 0) 1 2 0 0 #172# 0
100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 6 0) 8 (LOGBRUSH 0 0 4)
0.835356
COMMENT                                3.9973 0.7 2)
COMMENT                                #214=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
37029036 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                "Arial") 2.53336 0.666667 0 "HtoY"
"@N" 1 0
COMMENT                                0 -5.40373 20.9759 1.64103 0.846154
#213#)
COMMENT                                #215=(CShape
COMMENT                                (CWidget 0 (3 #22# 0) 1 2 0 0 #172# 0
100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 6 0) 8 (LOGBRUSH 0 0 4)
0.835356
COMMENT                                3.78575 0.7 2)
COMMENT                                #216=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
18088616 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT                                "Light-Const. chg 2.1-3" "@N" 1 0 0 -
7.491
COMMENT                                26.0426 7.64103 0.846154 #215#))
COMMENT                                (ObjectList))
COMMENT                                #217=(CGroupWidget
COMMENT                                (CWidget 25 (7 25 0) 1 2 0 0 Nil -736 100)
COMMENT                                (ObjectList
COMMENT                                #218=(CLine
COMMENT                                (CWidget 0 (3 #11# 0) 1 2 0 0 #167#
18088376
COMMENT                                100) (LOGPEN 0 6 32768) 8 0.835356
5.28402
COMMENT                                5.40641)
COMMENT                                #219=(CLabel (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
0 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                "Arial") 2.53336 0.666667 0 "SV40
polyA"

```

FIG.64 (continuación)

ES 2 540 802 T3

```

COMMENT                                "@N" 1 0 0 -12.2962 9.57581 3.79487
0.846154
COMMENT                                #218#)
COMMENT                                #220=(CLine
COMMENT                                (CWidget 0 (3 #28# 0) 1 2 0 0 #167#
18088384
COMMENT                                100) (LOGPEN 0 6 32768) 8 0.670712
3.60216
COMMENT                                3.72719)
COMMENT                                #221=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
37126836 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                "Arial") 2.53336 0.666667 0 "SV40
poly A"
COMMENT                                "@N" 1 0 0 -5.16093 27.3093 4.02564
0.846154
COMMENT                                #220#)) (CObjectList))
COMMENT                                #222=(CGroupWidget
COMMENT                                (CWidget 30 (7 30 0) 1 2 0 0 Nil 18088376
100)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #223=(CWideArrow
COMMENT                                (CWideLine
COMMENT                                (CWidget 0 (3 #15# 0) 1 2 0 0 #164#
28358516
COMMENT                                100) (LOGPEN 0 0 0) 1 (LOGBRUSH 0
128 0) 1
COMMENT                                0.509093 1.11209 1 0.082322) 0.8 1.8
0)
COMMENT                                #224=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
18088512 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT                                "Promoter (hCMV-MIE)" "@N" 1 0 0
14.3466
COMMENT                                3.77577 7.25641 0.846154 #223#)
COMMENT                                #225=(CWideArrow
COMMENT                                (CWideLine
COMMENT                                (CWidget 0 (3 #24# 0) 1 2 0 0 #164#
196625
COMMENT                                100) (LOGPEN 0 0 0) 1 (LOGBRUSH 0
128 0) 1
COMMENT                                4.74221 5.27979 1 0.082322) 0.8 1.8
0)
COMMENT                                #226=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
37176452 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34

```

FIG.64 (continuación)

ES 2 540 802 T3

```

COMMENT                                "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT                                "Promoter (hCMV-MIE) (from NotI)" "@N"
1 0 0
COMMENT                                -14.5466 12.1092 11.1795 0.846154
#225#))
COMMENT                                (CObjectList))
COMMENT                                #227=(CGroupWidget
COMMENT                                (CWidget 45 (7 45 0) 1 2 0 0 Nil -1015 100)
COMMENT                                (CObjectList)
COMMENT                                #228=(CWideArrow
COMMENT                                (CWideLine
COMMENT                                (CWidget 0 (3 #20# 0) 1 2 0 0 #189#
37110564
COMMENT                                100) (LOGPEN 0 0 52275) 1
COMMENT                                (LOGBRUSH 0 3407871 0) 1 5.98725
6.20619 1
COMMENT                                0.082322) 0.8 1.8 0)
COMMENT                                #229=(CLabel (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
0 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT                                "Heavy Chain 806 V-Region Insert" "@N"
1 0 0
COMMENT                                -19.2693 4.50909 11.2564 0.846154
#228#)
COMMENT                                #230=(CWideArrow
COMMENT                                (CWideLine
COMMENT                                (CWidget 0 (3 #23# 0) 1 2 0 0 #189#
37186028
COMMENT                                100) (LOGPEN 0 0 52275) 1
COMMENT                                (LOGBRUSH 0 3407871 0) 1 3.96459
4.16401 1
COMMENT                                0.082322) 0.8 1.8 0)
COMMENT                                #231=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
18088608 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT                                "Light-Chain 806 V-Region insert" "@N"
1 0 0
COMMENT                                -10.3851 19.7092 11.0256 0.846154
#230#))
COMMENT                                (CObjectList))
COMMENT                                #232=(CGroupWidget
COMMENT                                (CWidget 52 (7 52 0) 1 2 0 0 Nil 18088352
100)
COMMENT                                (CObjectList)
COMMENT                                #233=(CLine
COMMENT                                (CWidget 0 (3 #17# 0) 1 2 0 0 #154#
37060948
COMMENT                                100) (LOGPEN 0 6 6723840) 8 0.835356
COMMENT                                0.445258 0.509093)

```

FIG.64 (continuación)

```

COMMENT                                     #234=(CLabel
COMMENT                                     (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
18088512 100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                     (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                     "Arial") 2.53336 0.666667 0 "5'UTR 1"
"@N" 1
COMMENT                                     0 0 13.5592 4.50909 2.61538 0.846154
#233#)
COMMENT                                     #235=(CScratch
COMMENT                                     (CWidget 0 (3 #19# 0) 1 2 0 0 #154# 0
100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 6 6723840) 8 1 0.00896848
1.9
COMMENT                                     0.082322 1)
COMMENT                                     #236=(CLabel
COMMENT                                     (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
18088528 100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                     (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                     "Arial") 2.53336 0.666667 0 "5'UTR 2"
"@N" 1
COMMENT                                     0 0 15.7121 1.97573 2.61538 0.846154
#235#)
COMMENT                                     #237=(CScratch
COMMENT                                     (CWidget 0 (3 #25# 0) 1 2 0 0 #154# 0
100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 6 6723840) 8 1 4.24209 1.9
0.082322
COMMENT                                     1)
COMMENT                                     #238=(CLabel
COMMENT                                     (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
18088600 100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                     (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                     "Arial") 2.53336 0.666667 0 "5'UTR 2"
"@N" 1
COMMENT                                     0 0 -6.94704 15.9092 2.61538 0.846154
#237#)
COMMENT                                     #239=(Cline
COMMENT                                     (CWidget 0 (3 #27# 0) 1 2 0 0 #154#
268634520
COMMENT                                     100) (LOGPEN 0 6 6723840) 8 0.835356
4.67838
COMMENT                                     4.74221)
COMMENT                                     #240=(CLabel
COMMENT                                     (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
18088584 100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                     (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                     "Arial") 2.53336 0.666667 0 "5'UTR 1"
"@N" 1

```

FIG.64 (continuación)

ES 2 540 802 T3

```

COMMENT                                0 0 -8.96711 13.3758 2.61538 0.846154
#239#))
COMMENT                                (CObjectList))
COMMENT                                #241=(CGroupWidget
COMMENT                                (CWidget 53 (7 53 0) 1 2 0 0 Nil 18088360
100)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #242=(CWideArrow
COMMENT                                (CWideLine
COMMENT                                (CWidget 0 (3 #13# 0) 1 2 0 0 #152# 0
100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 6723840) 1
COMMENT                                (LOGBRUSH 0 10079334 0) 1 2.59031
3.04453 1
COMMENT                                0.082322) 0.8 1.8 1)
COMMENT                                #243=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
18088592 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                "Arial") 2.53336 0.666667 0
COMMENT                                "RNA (beta-lactamase) Amp(R)" "@N" 1 0
0
COMMENT                                6.3624 13.3758 9.74359 0.846154
#242#))
COMMENT                                (CObjectList))
COMMENT                                #244=(CGroupWidget
COMMENT                                (CWidget 54 (7 54 0) 1 2 0 0 Nil 268634520
100)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #245=(CWideArrow
COMMENT                                (CWideLine
COMMENT                                (CWidget 0 (3 #14# 0) 1 2 0 0 #152# 0
100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 6723840) 1
COMMENT                                (LOGBRUSH 0 10079334 0) 1 1.57476
2.20783 1
COMMENT                                0.082322) 0.8 1.8 0)
COMMENT                                #246=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #148#
18088520 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 0) 1
COMMENT                                (LOGFONT 32 12 0 0 700 0 0 0 0 3 2 1
34
COMMENT                                "Arial") 2.53336 0.666667 0 "mRNA (GS
cDNA)"
COMMENT                                "@N" 1 0 0 8.63373 10.8425 5.76923
0.846154
COMMENT                                #245#)) (CObjectList))) (CObjectList))
COMMENT                                #247=(CGroupWidget (CWidget 11 (8 0) 1 2 0 0 Nil -1088
100)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #248=(CGroupWidget
COMMENT                                (CWidget 1 (10 #0# 0) 1 2 0 0 Nil -1227 100)
COMMENT                                (CObjectList

```

FIG.64 (continuación)

```

COMMENT                                #249=(CScratch
COMMENT                                (CWidget 1 (1 #0# 1) 1 2 0 0 #155# 0
100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 3.6048 1.9
0.082322
COMMENT                                1)
COMMENT                                #250=(CLabel (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #157#
0 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 153) 1
COMMENT                                (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                "Georgia") 2.53336 0.555556 128
COMMENT                                "{\\i Bam}HI (5059)" "@N (@S)" 5 0 0 -
4.92823
COMMENT                                28.576 4.07692 0.692308 #249#))
(CObjectList))
COMMENT                                #251=(CGroupWidget
COMMENT                                (CWidget 1 (10 #1# 0) 1 2 0 0 Nil 678 100)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #252=(CScratch
COMMENT                                (CWidget 1 (1 #1# 1) 1 2 0 0 #155# 0
100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 1.57318 1.9
0.082322 1)
COMMENT                                #253=(CLabel (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #157#
0 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 153) 1
COMMENT                                (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                "Georgia") 2.53336 0.555556 128
COMMENT                                "{\\i Bgl}II (8910)" "@N (@S)" 5 0 0
8.917
COMMENT                                9.57581 3.41026 0.692308 #252#))
COMMENT                                (CObjectList))
COMMENT                                #254=(CGroupWidget
COMMENT                                (CWidget 1 (10 #3# 0) 1 2 0 0 Nil -320 100)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #255=(CScratch
COMMENT                                (CWidget 1 (1 #3# 1) 1 2 0 0 #155# 669
100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 5.98303 1.9
0.082322 1)
COMMENT                                #256=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #157#
18146168 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 153) 1
COMMENT                                (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                "Georgia") 2.53336 0.555556 128
COMMENT                                "{\\i Fse}I (551)" "@N (@S)" 5 0 0 -
14.4711
COMMENT                                7.04245 2.64103 0.692308 #255#))
COMMENT                                (CObjectList))
COMMENT                                #257=(CGroupWidget
COMMENT                                (CWidget 1 (10 #5# 0) 1 2 0 0 Nil 1368 100)
COMMENT                                (CObjectList

```

FIG.64 (continuación)

```

COMMENT                                #258=(CScratch
COMMENT                                (CWidget 1 (1 #5# 1) 1 2 0 0 #155#
1170 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 1.09257 1.9
COMMENT                                0.082322 1)
COMMENT                                #259=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #157#
37574220 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 153) 1
COMMENT                                (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                "Georgia") 2.53336 0.555556 128
COMMENT                                "{\\i Mlu}I (9821)" "@N (0S)" 5 0 0
11.05
COMMENT                                7.04245 3.25641 0.692308 #258#))
COMMENT                                (CObjectList))
COMMENT                                #260=(CGroupWidget
COMMENT                                (CWidget 1 (10 #6# 0) 1 2 0 0 Nil -739 100)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #261=(CScratch
COMMENT                                (CWidget 1 (1 #6# 1) 1 2 0 0 #155# 898
100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 5.26296 1.9
COMMENT                                0.082322 1)
COMMENT                                #262=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #157#
37173948 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 153) 1
COMMENT                                (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                "Georgia") 2.53336 0.555556 128
COMMENT                                "{\\i Not}I (1878)" "@N (0S)" 5 0 0 -
11.7199
COMMENT                                10.8425 3.17949 0.692308 #261#))
COMMENT                                (CObjectList))
COMMENT                                #263=(CGroupWidget
COMMENT                                (CWidget 1 (10 #7# 0) 1 2 0 0 Nil 27987292
100)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #264=(CScratch
COMMENT                                (CWidget 1 (1 #7# 1) 1 2 0 0 #155# 0
100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 3.95932 1.9
COMMENT                                0.082322 1)
COMMENT                                #265=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #157#
37188964 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 153) 1
COMMENT                                (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                "Georgia") 2.53336 0.555556 128
COMMENT                                "{\\i Pac}I (4387)" "@N (0S)" 5 0 0 -
6.086
COMMENT                                23.5093 3.33333 0.692308 #264#))
COMMENT                                (CObjectList))
COMMENT                                #266=(CGroupWidget

```

FIG.64 (continuación)

```

COMMENT                                (CWidget 1 (10 #9# 0) 1 2 0 0 Nil 16088384
100)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #267=(CScratch
COMMENT                                (CWidget 1 (1 #9# 1) 1 2 0 0 #155# 0
100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 3.45919 1.9
COMMENT                                0.082322 1)
COMMENT                                #268=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #157#
18088352 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 153) 1
COMMENT                                (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                "Georgia") 2.53336 0.555556 128
COMMENT                                "(\\i Sai)I (5335)" "@N (@S)" 5 0 0 -
3.73591
COMMENT                                29.8427 2.94872 0.692308 #267#))
COMMENT                                (CObjectList))
COMMENT                                #269=(CGroupWidget
COMMENT                                (CWidget 2 (10 #2# 0) 1 2 0 0 Nil -181 100)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #270=(CScratch
COMMENT                                (CWidget 1 (1 #2# 1) 1 2 0 0 #155# 0
100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 6.20619 1.9
COMMENT                                0.082322 1)
COMMENT                                #271=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #147# 393229
100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 13408563) 1
COMMENT                                (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                "Georgia") 2.53336 0.555556 0
COMMENT                                "(\\i Dra)III (128)" "@N (@S)" 5 0 0 -
15.8185
COMMENT                                3.24241 3.41026 0.692308 #270#)
COMMENT                                #272=(CScratch
COMMENT                                (CWidget 2 (1 #2# 2) 1 2 0 0 #155# 508
100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 5.98725 1.9
COMMENT                                0.082322 1)
COMMENT                                #273=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #147# 945
100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 13408563) 1
COMMENT                                (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                "Georgia") 2.53336 0.555556 0
COMMENT                                "(\\i Dra)III (543)" "@N (@S)" 5 0 0 -
14.9124
COMMENT                                5.77577 3.48718 0.692308 #272#))
COMMENT                                (CObjectList))
COMMENT                                #274=(CGroupWidget
COMMENT                                (CWidget 2 (10 #4# 0) 1 2 0 0 Nil 678 100)
COMMENT                                (CObjectList

```

FIG.64 (continuación)

```

COMMENT                                #275=(CScratch
COMMENT                                (CWidget 1 (1 #4# 1) 1 2 0 0 #155#
1393 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 6.27266 1.9
COMMENT                                0.082322 1)
COMMENT                                #276=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #147#
37174492 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 13408563) 1
COMMENT                                (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                "Georgia") 2.53336 0.555556 0
COMMENT                                "{\\i Hin}dIII (2)" "@N (@S)" 5 0 0 -
15.9515
COMMENT                                1.97573 3.10256 0.692308 #275#)
COMMENT                                #277=(CScratch
COMMENT                                (CWidget 2 (1 #4# 2) 1 2 0 0 #155# 0
100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 4.23259 1.9
COMMENT                                0.082322 1)
COMMENT                                #278=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #147#
28387876 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 13408563) 1
COMMENT                                (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                "Georgia") 2.53336 0.555556 0
COMMENT                                "{\\i Hin}dIII (3869)" "@N (@S)" 5 0 0
COMMENT                                -7.71376 17.1759 4.23077 0.692308
#277#)
COMMENT                                (CObjectList)
COMMENT                                #279=(CGroupWidget
COMMENT                                (CWidget 2 (10 #8# 0) 1 2 0 0 Nil 1 100)
COMMENT                                (CObjectList
COMMENT                                #280=(CScratch
COMMENT                                (CWidget 1 (1 #8# 1) 1 2 0 0 #155#
37028212
COMMENT                                100) (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1
4.16401 1.9
COMMENT                                0.082322 1)
COMMENT                                #281=(CLabel
COMMENT                                (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #147#
28372436 100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 0 13408563) 1
COMMENT                                (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                "Georgia") 2.53336 0.555556 0
COMMENT                                "{\\i Rsr}II (3999)" "@N (@S)" 5 0 0 -
7.08453
COMMENT                                18.4426 3.5641 0.692308 #280#)
COMMENT                                #282=(CScratch
COMMENT                                (CWidget 2 (1 #8# 2) 1 2 0 0 #155# 0
100)
COMMENT                                (LOGPEN 0 6 10053171) 8 1 3.96459 1.9
COMMENT                                0.082322 1)
COMMENT                                #283=(CLabel

```

FIG.64 (continuación)

ES 2 540 802 T3

```

COMMENT                                     (CWidget 0 (0 0) 1 2 0 0 #147#
28374716 100)
COMMENT                                     (LOGPEN 0 0 13408563) 1
COMMENT                                     (LOGFONT 27 10 0 0 400 0 0 0 3 2 1
18
COMMENT                                     "Georgia") 2.53336 0.555556 0
COMMENT                                     "(\\i Rsr)II (4377)" "@N (@S)" 5 0 0 -
6.14723
COMMENT                                     22.2426 3.41026 0.692308 #282#))
COMMENT                                     (CObjectList))) (CObjectList))
COMMENT                                     #284=(CGroupWidget (CWidget 14 (16 0) 1 2 0 0 Nil 18088384
100)
COMMENT                                     (CObjectList) (CObjectList))
COMMENT                                     #285=(CGroupWidget (CWidget 12 (0 0) 1 2 0 0 Nil 18088384
100)
COMMENT                                     (CObjectList) (CObjectList))) (CObjectList)))
COMMENT                                     (CSeqView 10 10 (CObjectList) (CObjectList) 1 (CObjectList)) (CObjectList)
1095072823
COMMENT                                     (CStringList) 1145656400 2084918081 (CObjectList)))
FEATURES                                     Location/Qualifiers
  C_region                                  553..1643
                                             /vntifkey="2"
                                             /label=GeneArt\HC\C-Reg
                                             /note="GeneArt human HC C-Reg"
  polyA_signal                              1644..1875
                                             /vntifkey="25"
                                             /label=SV40\polyA
  misc_feature                              7356..7699
                                             /vntifkey="21"
                                             /label=Signal\ (SV40E\ (and\SV40\ori))
                                             /note="SV40E (and SV40 ori)"
  misc_RNA                                  complement (6121..6981)
                                             /vntifkey="53"
                                             /label=RNA\ (beta-lactamase)\Amp (R)
                                             /note="beta-lactamase"
  mRNA                                       7707..8906
                                             /vntifkey="54"
                                             /label=mRNA\ (GS\cDNA)
                                             /note="GS cDNA"
  promoter                                  9784..10926
                                             /vntifkey="30"
                                             /label=Promoter\ (hCMV-MIE)
                                             /note="hCMV-MIE promoter"
  intron                                    8909..9760
                                             /vntifkey="15"
                                             /label=Intron\ (SV40\intron\+\poly\A)
                                             /note="SV40 intron + poly A"
  5'UTR                                     10927..11047
                                             /vntifkey="52"
                                             /label=5'UTR_1
                                             /note="5'UTR"
  intron                                    11048..11874
                                             /vntifkey="15"
                                             /label=Intron_1
                                             /note="intron"
  5'UTR                                     11875..11891

```

FIG.64 (continuación)

```

                /vntifkey="52"
                /label=5'UTR_2
                /note="5'UT"
V_region      128..542
                /vntifkey="45"
                /label=Heavy\Chain\806\V-Region\Insert
modified_base 4315..4315
                /vntifkey="23"
                /label=HtoY
                /note="Histidine-to-Tyrosine change in the 806 Light-Chain"
variable CDR3 region"
modified_base 4716..4716
                /vntifkey="23"
                /label=Light-Const.\chg\2.1-3
                /note="Light-chain c-region change 2.1-3"
V_region      3999..4376
                /vntifkey="45"
                /label=Light-Chain\806\V-Region\insert
promoter      1884..2902
                /vntifkey="30"
                /label=Promoter\ (hCMV-MIE) \ (from\NotI)
                /note="Promoter (hCMV-MIE) (from NotI)"
5'UTR         3851..3867
                /vntifkey="52"
                /label=5'UTR_2
                /note="5'UT"
intron        3024..3850
                /vntifkey="15"
                /label=Intron_1
                /note="intron"
5'UTR         2903..3023
                /vntifkey="52"
                /label=5'UTR_1
                /note="5'UT"
polyA_signal  4827..5063
                /vntifkey="25"
                /label=SV40\poly\A
                /note="SV40 poly A"
C_region      4390..4800
                /vntifkey="2"
                /label=Codon-Optimized\Kappa\Constant\Region
BASE COUNT    3000 a      3039 c      2868 g      2984 t
ORIGIN
1  aagcttgccg ccaccatgga ttggacctgg cgcattctct ttctggtagc agccgccaca
61  ggtaaggggc tgccaaatcc cagtgaggag gaagggatcg aaggtcacca tcgaagccag
121  tcaccacagt aagggggggt ccattccact ctgtgtcttc tctacaggtg tccacagcca
181  ggtgcagctc caagagagtg gacctgggct tgtcaagccg agtcaaactt tgtccctaac
241  atgtactgtg tccggatact ctatctcctc agattttggc tgggaattgga taaggcagcc
301  accagggaaa ggtttagaat ggatgggcta catatcctac tctgggaaca ccagatatca
361  accttctctg aaaagccgga tcacaatcnc aagggacacg tcgaagaatc agtcttctcc
421  gaaactgaac tccgttacag ccgcagacac agcaacatat tactgcgtaa ccgctggcag
481  aggcttcccc tattggggac agggcaccct agtgacagtg agcagcggta agatggcaca
541  ccgtggccgg cctctgcgcc tgggcccagc tctgtcccac accgcccgtc caaggcacc
601  tttctcttcc agctccacc aagggcccca gctgttccc cctggcccc agcagcaaga
661  gcaccagcgg cggcacagcc gccctgggct gccctggtga ggactacttc cccgagcccc
721  tgaccgtgag ctggaacagc ggaaccctga cctccggcgt gcacaccttc cccgcccgtc

```

FIG.64 (continuación)

```

781 tgcagagcag cggcccgctac agcctgagca ggcgggtgac cgtgcccagc agcagcctgg
841 gcacccagac ctacatctgc aacgtgaacc acaagcccag caacaccaag ytggaacaag
901 aggtggagcc caagagctgc gacaagaccc acacctgcc cccctgccc gcccagagc
961 tgctggggcg accccctgtg tccctgttcc cccccaagcc caaggacacc ctgatgatca
1021 gcaggacccc cgagytgacc tggcggtgg tggacgtgag ccacgaggac ccagaggtga
1081 agttcaattg gtatggggac ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag cccagagaag
1141 agcagtaaca cagcacctac agggctggtg cctgctgac cgtgctgac caggactggc
1201 tgaacggcaa ggaatacaaa tgcaggctct ccaacaaggc cctgcccagc cccatcgaa
1261 agaccatcag caaggccaag gcccagccac gggagcccca ggtgtacacc ctgccccct
1321 cccgggacga gtgcaccaag aaccaggtgt cctgacctg tctggtgag ggtctctacc
1381 ccagcgacat cgcctggag tgggagagca accgcccagc cgagaacaac tacaagacca
1441 cccccccagt gctggacagc gacggcagct tcttctgta cagcaagctg accgtggaca
1501 agagcaggtg gcagcagggc aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca
1561 accactacac ccagaagagc cagagcctgt cccccggca gtgatgacga cgcggccgtg
1621 cggacgaccg aattcattga tcaaatcag ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc
1681 tttaaaaaac ctcccacacc tccccctgaa cctgaaacat aaaatgaaty caattgttgt
1741 tgtaaacttg tttattgacg cttataatgg ttacaataaa agcaatagca tcacaattt
1801 cacaaaataa gcattttttt cactgcttcc tagttggtgt ttgcccacac taatcaatgt
1861 atctllatcau gctctggcggc cgcgatatt tgaatatatg ccataatgaa aatgtcggc
1921 atgtgagttt ctgtgtaact gatctgcaca tttttccaaa agtgattttt gggcatacgc
1981 gatctctggc gatagcgtt atatcgttta cgggggatgg ccgatagcga ctttgggtgac
2041 ttggggcagat ctgtgctgctg caaatatcgc agttctgata taggtgacag acgatatgag
2101 gctatactgc ccgatagagg gacaccaagc tggcacagg ccgatgcata tccatctata
2161 cattgaatca atattggcca ttagccatct tatcattgg ctatatagca taatcaata
2221 ttggctattg gccattgcat acgttctatc catatcataa tatgtacatt tatattgct
2281 catgtccaac attaccgcca tgttgacatt gattattgac tagttattaa tagtaatcaa
2341 ttaccggggc atttagtcat agcccataaa tggagttccg cgttacabaa ctacggtaa
2401 atggcccgcg tggctgaccg cccaagcacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgatg
2461 tccccatgt aacggcaata gggactttcc attgacgtca atygtgag tatttaccgt
2521 aaactgccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacc
2581 tcaatgacgg taatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggacttcc
2641 ctacttggca gtacaactac gattagtca tccctattac catgggtgag cggttttggc
2701 agtacatcaa tggcgctgga tagcggtttg actcagggg atttccaagt ctccaccca
2761 ttgacgtcaa tgggagttg ttttggcacc aaaatcaacc ggaacttcca aaatgtccta
2821 acaactccgc cccattgacg caaatggcg gtaggcgtgt accggtggag gcttatataa
2881 gcagagctcg ttagtgaac cgtccagatc cctggagacg ccacccagc tgtttgacc
2941 tccatagaag acaccgggac ccgatccagc tccgcccgc ggaacggtgc atgggacgc
3001 ggattcccc tgcacagagt gacgtaagta cccctatag agtctatagg cccaccccct
3061 tggcttctta tgcctgatg actgtttttg gcttggggtc tataacccc cgttccctca
3121 tcttataggc gatgctatag cctagccat aggtgtgggt tattgacct taatgaccac
3181 tccccatbtg gtgacgatac tttccattac caatccaaa catggctctt tgcacaact
3241 ctctttattg gctatatgcc aatacactgt ccttcagaga ctgacagga ctctgtattt
3301 ttacaggatg gggctctcatt tattatttac aaatccat atacaacacc accgtcccc
3361 gtgcccgcag tttttattaa acataacgtg gcatctccac gcgaatctcg ggtacgtgtt
3421 cgggacatgg gctctctcc ggtagcggcg gacctctac atcccagccc tgcctccatg
3481 cctccagcga ctcatggctg ctggcagct ccttgcctct aacagtggag gccagactta
3541 ggcacagcac gatgcccacc accaccagtg tgcgcacaa ggcctggcg gtagggtatg
3601 tctctgaaaa ttagctcggg gagcgggctt gcaccgctga ccatttggg agacttaagg
3661 cagcggcaga agaagatgca ggcagctgag tngttrggt ctgataagag tccagagtaa
3721 ctcccgttg cgtgcgctta accgtggagg gcagtgtag ctgacagta ctctgtctg
3781 ccgcgcgcgc caccagacat aatagctgac agactaacag actgttctct tccatgggtc
3841 tttctgacg taccgctct tgacacgaag cttgcccga ccattggatt gactgggaga
3901 atactgttcc ttgtagcagc cgcacaggtt aagggctgc caaatcccag tgaggaggaa
3961 gggatcgaag gtgaccatcg aagccagtca agggggcgga ccgcttccat ccaactctgt
4021 gtctctctca caggtgttca cagtgatatt cagatgactc agagtccatc cagcatgtca
4081 gtctccgtgg gagatagggt gacgataacc tctcattcaa gccaaacat caactccaat

```

FIG.64 (continuación)

4141 attggatggc tccaacagaa goctggtaag tccctcaaag gactaaacta tcacggaaca
 4201 aacttggacg acggcgtgcc atcgagattt tcagggctctg gcagcgggac cgactataca
 4261 ctgaccatct ctagcttaca accagaggac tttgacacat actactggtt ccagtagcct
 4321 cagttccoct ggacattcgg cggcggcaca aaacthggaaa tcaaacgtga gttagcggctc
 4381 gttaatuaaa gacccttcta aactcggagg gggctggatg acgtggccat tgttacttaa
 4441 acaccatcct gtttgcctct tccctcagga accgtcgcag ctccctccgt gtccatcttc
 4501 ccccatccg acgagcaact gaagtcaggc acagcctccg tgggtgctc ccttaataac
 4561 ttttaccocaa gagaggccaa agtccagtg aaagtggaca acgcactaca gagcgggaac
 4621 tctcaggaaa gcgtgacaga gcaggactca aaagattcaa catacagcct acctctacc
 4681 ctgacactgt caaaagctga ttatgaaaag cacaaagtat atgctctga agtaactcat
 4741 cagggactca gcagccctgt cactaaaagt ttaatagag gcyaatgctg ataagcggcc
 4801 gtggggacga ccgaattcat tgatcataat cagccatacc acattttag aggttttact
 4861 tgctttaaaa aacctcccac acctcccct gaacctgaaa cataaaatga atgcaattgt
 4921 tgttggtaac ttgttbatg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcacacaaa
 4981 tttcacaat aaagcatttt tttcactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa
 5041 tctatcttat catgtctgga tccctacgc cggacyctc gtggccggca tcaccggcgc
 5101 cacagggtgg gttgctggcg cctatatcgc ccacatcacc gatggggaag atcgggctcg
 5161 ccacttcggg ctcatgagcg cttgtttcgc cgtgggtatg gtggcaggcc ccgtggccgg
 5221 gggactgttg ggcgccatct ccttctcag accattcctt gcggcggcgg cataagggag
 5281 cctcaacctc ctactgggtt gcttctaact gcaggagtgc ctaagggag agcgtogacc
 5341 tggggccggg ttgctggcgt ttttccatag gctccgccc cctgacgagc atcacaaaa
 5401 tggacgctca agtcagaggt ggcgaaacc gacaggacta taaagatacc aggctttcc
 5461 ccttgggaagc tccctcgtgc gctcctctgt tccgaccctg ccgtttaccg gatacctgtc
 5521 cgcctttctc ccttccggaa gcgtggcgt ttcctatagc tcaccctgta ggtatctcag
 5581 ttccgtgtag ctgcttccct ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccg ttcagcccga
 5641 ccgttggccc ttatccggta actatcgtct tgagtcacc ccggtaaagc acgacttato
 5701 gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag cgggtgctac
 5761 agatttcttg aagtggtggc ctaactacgg ctacactaga agaacgtat ttggtagctg
 5821 cgcctcgtct aagccagtta ccttcgaaa aagagtgtgt agctcttcat ccggcaaaaa
 5881 aaccaccgct ggtagcgggt gttttttgt ttgcaagcag cagattaccg ccagaaaaaa
 5941 aggatorcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgtcagi ggaacgaaaa
 6001 ctccagttaa gggatttttg tcatgagat atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt
 6061 aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatata gagtaactt ggtctgacag
 6121 ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctacagcctc tgtctatttc gttcatccat
 6181 agttgcctga ctccccctcg tctagataac tacgataccg gagggttac catctggccc
 6241 cagtgccgca atgataccgc gagaccacc ctccaccgct ccagatttat cagcaataaa
 6301 ccagccagcc ggaagggcgg agcgcagaag tggcctgca actttatccg cctccatcca
 6361 gcttattaat tgttgcggg aagctagagt aagtagtctg ccagtaata ttttgcgcaa
 6421 cgttcttggc attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg tcttctgta ggttccatt
 6481 cagctccggg tcccaacgat caaggcaggt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc
 6541 ggttagctcc ttgggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgag ttttaucact
 6601 catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccattccgtaa gatgcttttc
 6661 tctgactggt gactactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tctatgccc gaccgagtgt
 6721 ctcttggccc gcgtcaatac gggataatac cgcgcccacat agcagaactt taaaagtct
 6781 catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttagatc
 6841 cagttcgatg taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcactttta ctttccaccg
 6901 cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgcccga aaaaagggaa taaggcggac
 6961 accgaaatgt tgaatactca tactcttctt tttcaatat tattgaagca tttatcaggg
 7021 ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaatagggtt
 7081 tccgcccaca tttcccga aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta ttaicatgac
 7141 attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gccctgatgg ctctttgccc caccatcgt
 7201 tctaatgtt ccgtggcacc gaggacaacc ctcaagagaa aatgtaatca cactggctca
 7261 cctcggggtg ggccttctct cgtttataag gagacacttt atgttaaga aggttggtaa
 7321 attccttggc gcttggcag ccaagctaga tccggctgtg gaaagtgtgt cagttagggt
 7381 gtggaagtc ccaggctcc ccagcaggca gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt
 7441 cagcaaccag gttggaag tcccaggct ccccaggcag cagaagtatg caaagcatgc

FIG.64 (continuación)

```

7501 atctcaatta gtcagcaacc aragtcocgc cccaaactcc gcccatcccg cccctaactc
7561 cggccagttc cggccattct cggcccatg gctgactaat tttttttatt tatgcagagg
7621 ccgaggccgc ctccgctctt gagctattcc agaagtatgt aggaggcttt tttggaggcc
7681 taggcttttg caaaaagcta gcttgggggc accgctcaga gccacctcca ccattggccac
7741 ctccagcaagt tcccacttga acaaaaacat caagcaaatg tacctgtgoc tggcccaggg
7801 tgagaaagtc caagccatgt aratctgggt tgauggtact ggagaaggac tggcctgcaa
7861 aaccgcacc ctggactgtg agcccaagtg tgtagaagag ttacctgagt ggaattttga
7921 tggctctagt acctttcagt ctgagggcct caacagtgac atgtatctca gccctgttgc
7981 catgtttcgg gaccccttcc gcagagatcc caacaagctg gtgttcctgt aagttttcaa
8041 gtacaaccgg aagcctgcag agaccaatth aaggcacucg tgtaaaccga taatggacat
8101 ggtgagcaac cagcaccctt ggtttggaat ggaacaggag tatactctga tgggaacaga
8161 tgggcaccct tttggttggc cttccaatgg ctttccctgg ccccaaggtc cgtattactg
8221 tgggtgtggc gcagacaaag cctatggcag gcatatctgt gaggctcact acccgccctg
8281 ctgttatgct ggggtcaaga ttacaggaac aaatgctgag gtcattgctg cccagtggga
8341 actccaata gacccctgtg aaggaatccc catgggagat catctctggg tggcccgttt
8401 catcttgcac cgaqtatgtg aagactttgg gctaatagca acctttgacc ccaagcccat
8461 tccctgggac tggaatggtg caggctgcca taccactttt agcaccagg ccattgaggga
8521 ggagaaragt ctgaagcaca tggaggaggc catcgagaaa ctaagcaagg ggcaccggtg
8581 ccacattcga gctacgata ccaagggggg cctggacaat gccctgtgtc tgaactgggt
8641 ccagcaaacg tccaacatca accacttttc tctgtgtgtc gccaatgca gtgccagcat
8701 ccgattccc cggactgtcc gccaggagaa gaaaggttac tttgaagacc cggcccccct
8761 tcccattgga gacccctttg cagtgcacaga agccatctgt ccacatgcc ttctcaatga
8821 gactggcgac gagcccttcc aatacaaaaa ctaattagac tttgagtgar cttgagcctt
8881 tccctagttc tcccaccccg ccccagagag atctttgtga aggaacctta ctctgtgtgt
8941 gtgacataat tggacaaact acctacagag atttaaagct ctaaggtaaa tataaaatth
9001 ttaagtgtat aatgtgttaa actactgatt ctaattgttt gtgtatttta gattccaacc
9061 targgaactg atgaatggga gcagtggggg aatgccttta atgaggaaaa ccggttttgc
9121 tcagaagaaa tggcatctag tgatgatgag gctactgctg actctcaaca ttctactcct
9181 ccaaaaaaga agagaaaggt agaagacccc aaggactttc cttcagaatt gctaagtttt
9241 ttgactcag ctgtgtttag taatagaact cttgcttgtt ttgctattta caccacaag
9301 gaaaaagctg cactgctata caagaaatth auggaaaaat atctctaac cttataagt
9361 aggcataaca gttataalca taacatacug tttttctta ctccacacag cctatagagt
9421 tctgctatta ataactatgc tcaaaaattg tgtaccttta gotttttaat ttgtaaaggg
9481 gtttaataagg aatatttgat gtatagtgc ttgactagag atcataatca gccataccac
9541 atttgttagg gttttacttg ctttaaaaaa cctcccacac ctcccctga acctgaaca
9601 naaaatgaat gcaattgttg ttgtbaactt gtttatggca gccataatg gttacaaata
9661 aagcaatagc atcacaatth tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt ctagtgtgtg
9721 tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttatca tgtctggate tagcttcgtg tcaaggacgg
9781 tgactgcagt gaataataaa atgtgtgttt gtccgaaata ccggttttga gatttctgtc
9841 gccgactaaa ttcatgtcgc gcgatagggg tgtttatcgc cगतagagat ggggatattg
9901 gaaaaatcga taattgaaaa tatggcatat tgaaaatgtc gccgatgtg gtttctgtgt
9961 aactgatac gccatttttc caaaagtgt ttttggycat accgcatatc tggcगतagc
10021 gcttatatcg tttacggggg atggcgatag accactttgg tgaactgggc gattctgtgt
10081 gtcgcaata tgcagtttc gatataagtg acagacgata tgggctata tggccgatag
10141 aggcgacatc aagctggcac auggccaaug catatcgate tatacaatga atcaatattg
10201 gccattagcc atattattca ttggctatat agcataaalc aatattggct attggccatt
10261 gcatacgttg tatccatate abaatatgta cttttatatt ggtctatgtc caacattacc
10321 gccatgttga cattgattat tgaactagta ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattagt
10381 tcatagccca taatggagt tcccgcttac ataacttacg gtaaatggcc cgcctggctg
10441 accgcccac gaccccgcc cattgacguc aataatgacg tatgttccca tagtaaaggc
10501 aatagggact ticcattgac gtcaatgggt ggagtattta ccgtaaaact cccacttggc
10561 agtacatcaa gtgtatcata tggcaagtac gcccctattt gacgtcaatg accgtaaatg
10621 gccgcctyg cattagccc agtacatgac cttatgggac ttctcactt ggcagtacat
10681 ctactatga gcatcgca ttaccatggt gatggcgttt tggcagtaca tcaatggggc
10741 tggatagcg tttgactcac ggggatttcc aagctcccac cccattgacg tcaatggggg
10801 tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tcaaaaatgt cgtaaact cccgccatt

```

FIG.64 (continuación)

ES 2 540 802 T3

```

10861 gacgcaaatg ggccgtaggc ggtacggcg ggaggctctat ataagcagag ctcgtttagt
10921 gaaccgtcag atcgcctgga gacgccatcc acgctgtttt gacctccata gaagacaccg
10981 ggaccgatcc agcctccggc gccgggaacg gtgcattgga acgaggatcc cccgtgccaa
11041 gagtgacgta agtaccgctc anagagtcca taggcccacc cccctggcctt cttatgcagc
11101 ctatacsgtt ttggccttgg ggtctatata cccccgctc ctcatgttat aggtgatggt
11161 atagcttagc ctataggtgt gggttattga ccattattga ccactccctt atgggtgacc
11221 atactttcca ttactaatcc ataacatggc tctttgccac aactctcttt attggctata
11281 tgccaataca ctgtccttca gagactgaca cggactctgt atttttacag gatggggtct
11341 cauttattat ttacaaatcc acatatacaa caccaccgtc cccagtgccc gcagttttta
11401 ttaaacataa cgtgggatct ccacgcgat ctccgggtacg tgtcccggac atgggctctt
11461 ctccggtagc ggccgagctt ctacatccga gccctgctcc catgcccoca cgcactcatg
11521 gtcgctcggc agctccttgc tctaacagc ggagcccaga cttaggcaca gcacgatgcc
11581 caccaccacc agtgtgcgcg acaaggcctt ggccgtaggg tatgtgtctg aaaatgagct
11641 cggggagcgg gcttgcaccg cgcagcatt tggagactt aaggcagcgg cagaagaaga
11701 tgcaggcagc tgagttgttg tgtctgata agagtcagag gtaactcccg ttgcggtgct
11761 gttaacggtg gagggcagtg tagtctgagc agtactcgtt gctgcgcgcg gcgccaccag
11821 acataatagc tgacagacta acagactgtt cctttccatg ggtcttttct gcagtcaccg
11881 tccttgacac g

```

//

FIG.64^(continuación)

Cadena ligera

CDR1-806 ₂₃HSSQDINSNIG
 CDR1-175 ₂₃HSSQDISSNIG
 CDR2-806 ₄₈YHGTNLDD
 CDR2-175 ₄₉YHGTNLED
 CDR3-806 ₈₃VQYAOFPWT
 CDR3-175 ₈₅VQYGQFPWT

Cadena pesada

CDR1-806 ₃₁SDPRAWN
 CDR1-175 ₃₁SDYAWN
 CDR2-806 ₅₁YISYGNTRYNPSLKS
 CDR2-175 ₅₁YISYANTRYNPSLKS
 CDR3-806 ₉₇VIAGRGEFY
 CDR3-175 ₉₇ATAGRGEFY

Se proporciona el número del primer residuo
 El subrayado indica el residuo que contacta con EGFR287-302

FIG.65

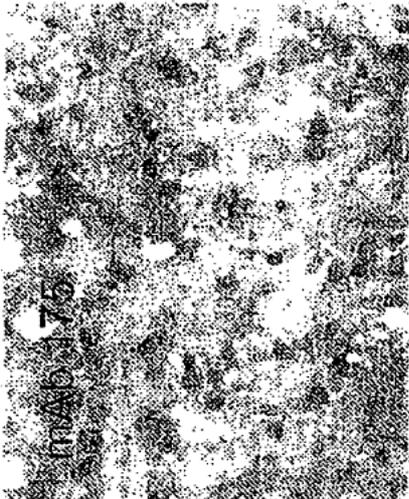
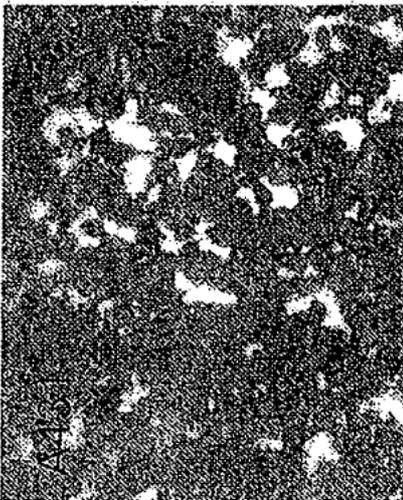
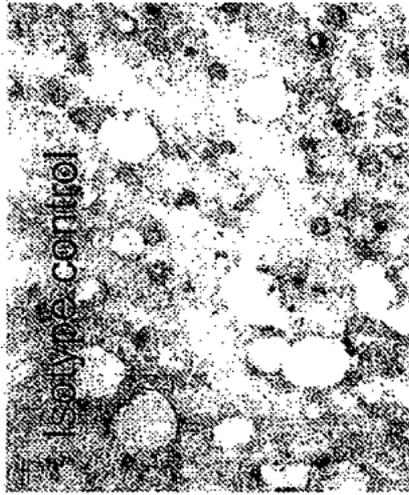
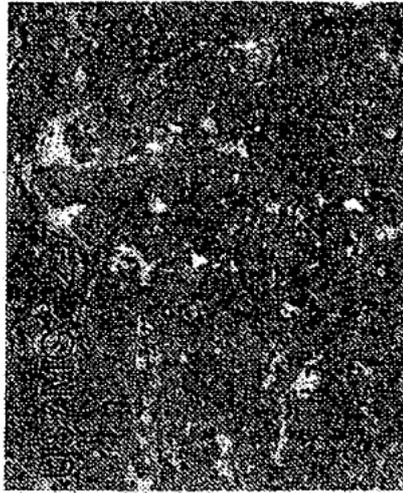
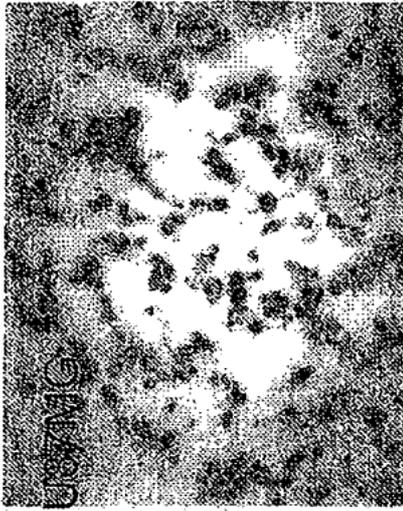


FIG. 66A

FIG. 66B

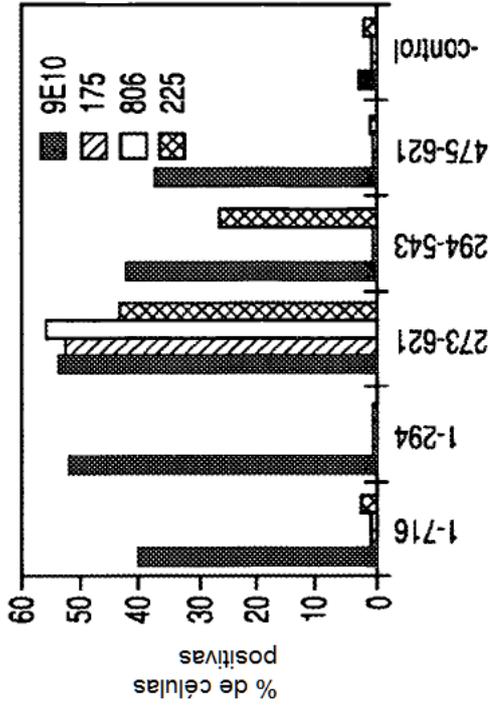


FIG. 67B

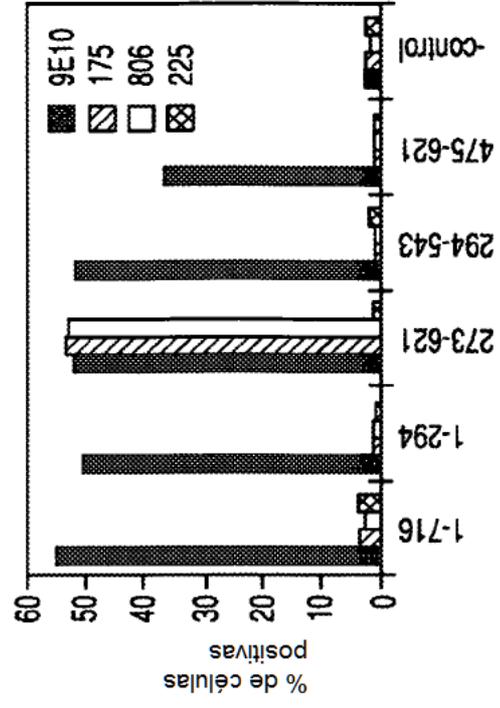


FIG. 67C

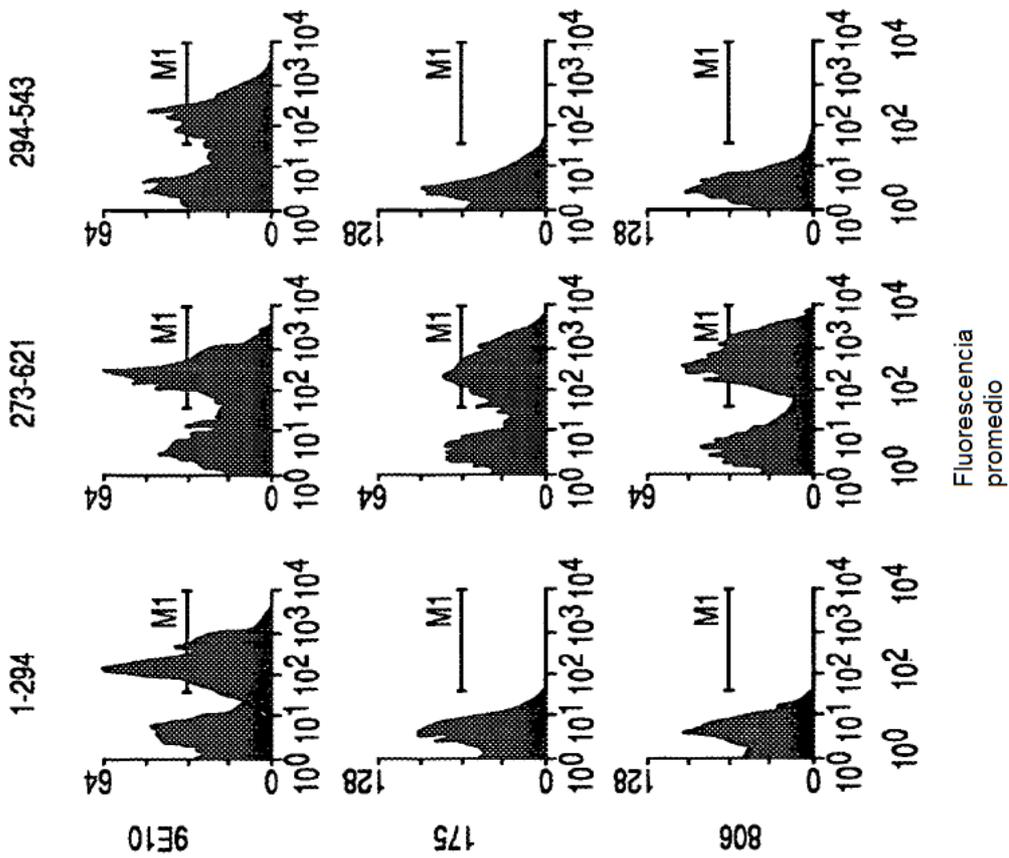
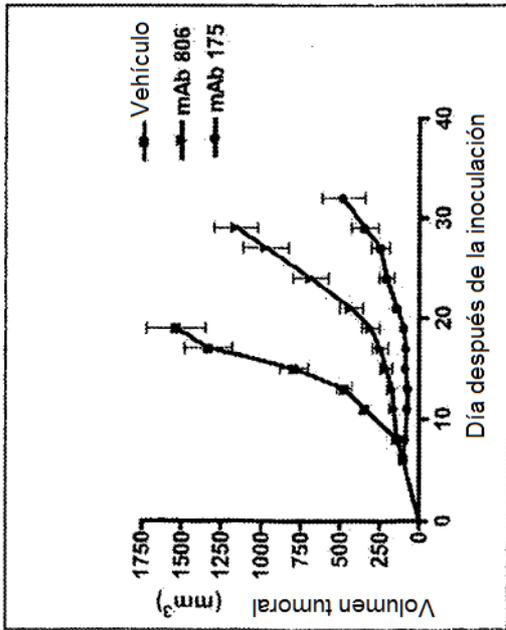
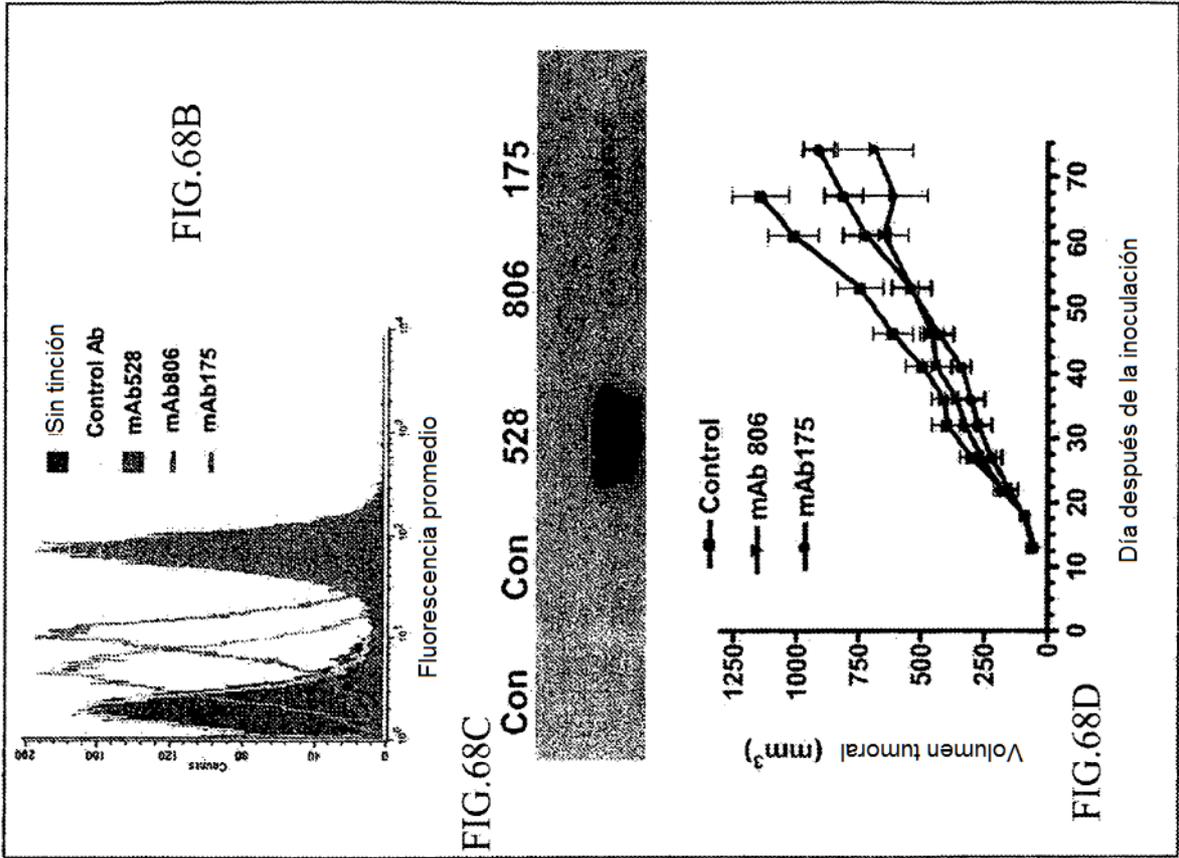


FIG. 67A



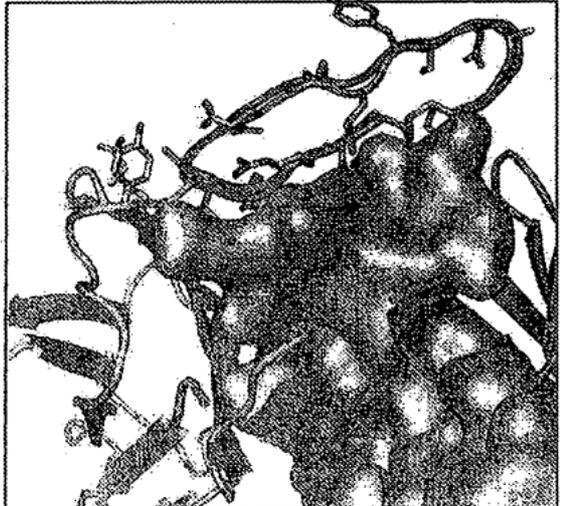
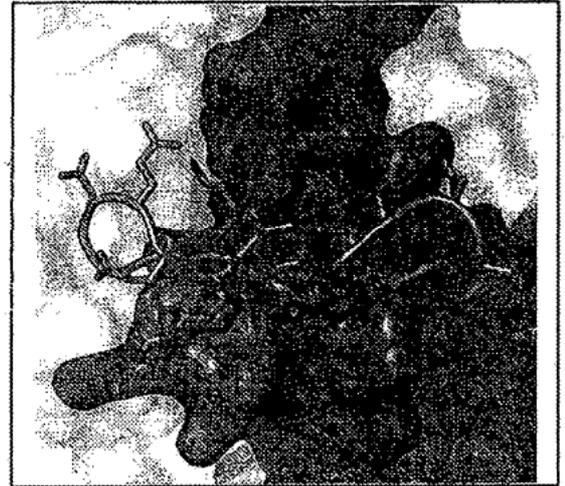
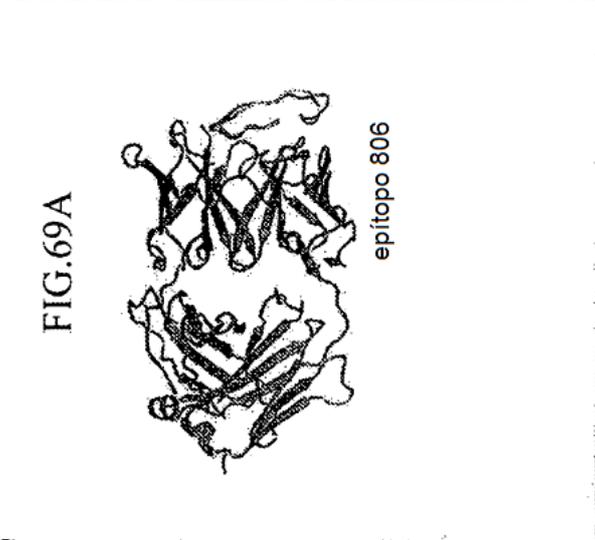
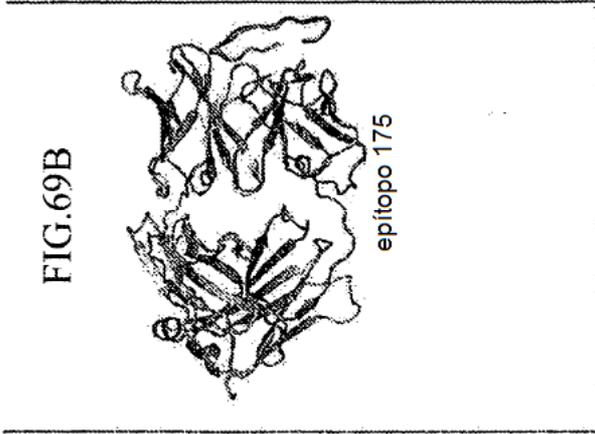
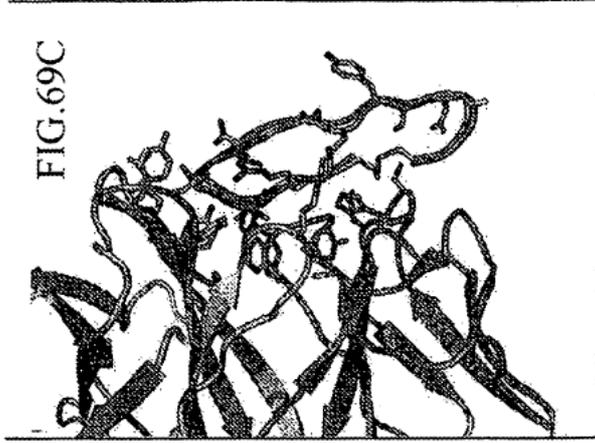


FIG.69F

FIG.69E

FIG.69D

FIG.71A



FIG.71B



FIG.71C



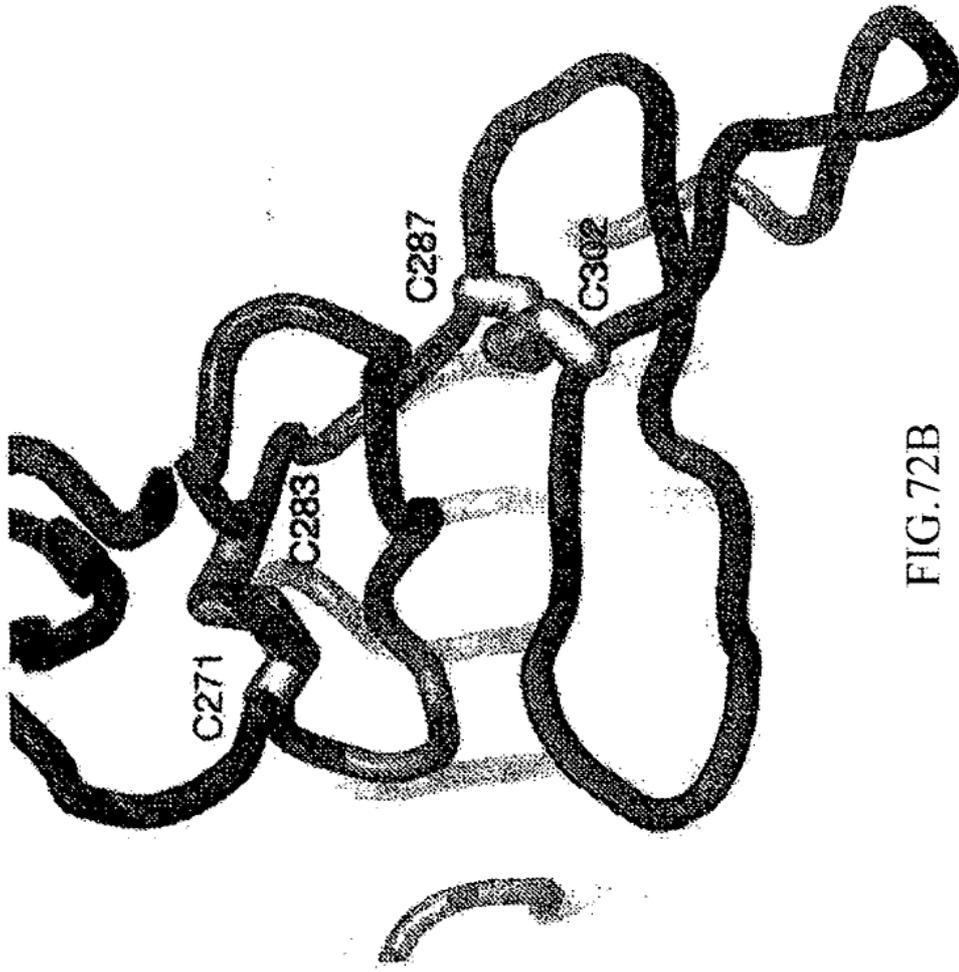


FIG.72B

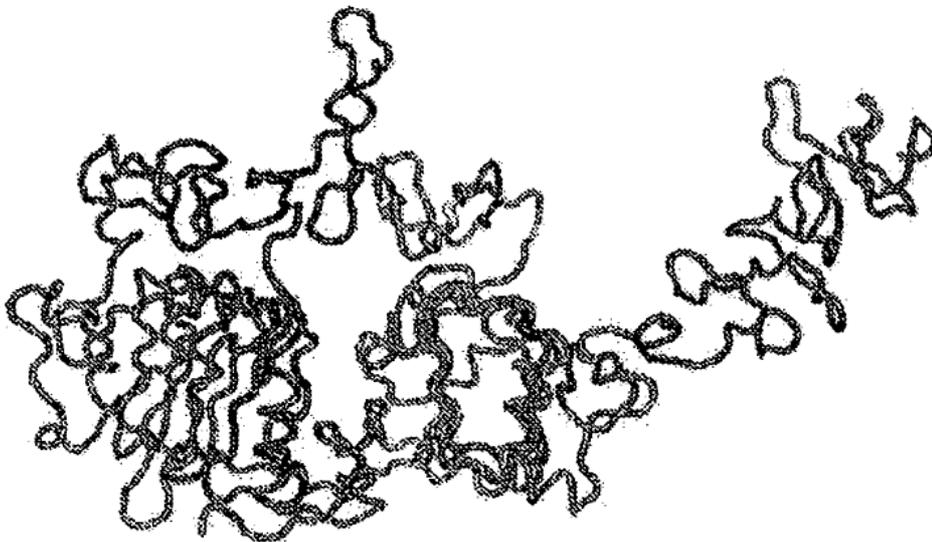


FIG.72A

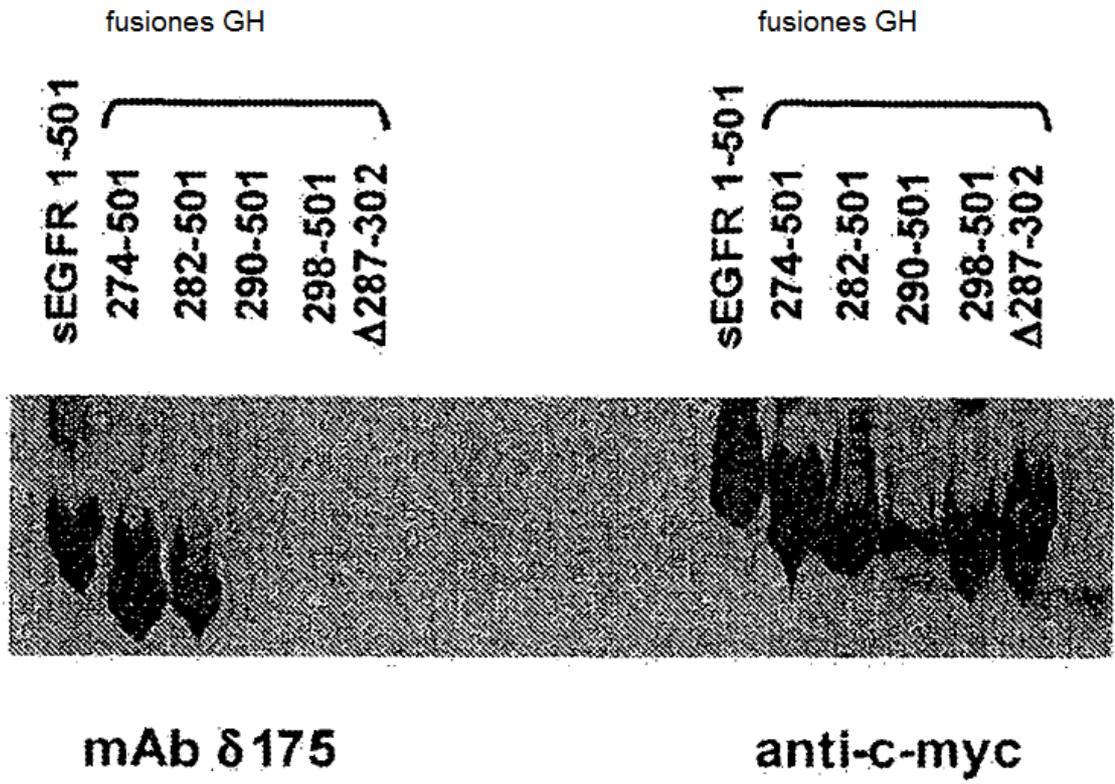


FIG.73

Cadena VH de mAb175: Secuencia de ácidos nucleicos y aminoácidos

Secuencia de ácidos nucleicos

TTAGTCAAAGCTGCAGGAGTCTGGACCTAGCCTGGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTCACCTGCACTGTCACTGGGCTA
 CTCAATCACCACTGACTATGCCCTGGAAGTCCGGCAGTTCCAGGAAACAACACTGGAGTGGATGGGCTACATAAG
 TTACAGTGCTAACACTAGGTACAACCCATCTCTCAAAGTCGAACTCTATCACTCGAGACACATCCCAAGAACCAATTC
 TTCCTGCAGTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATAATTACTGTGCAACGGGACGCGGGTTTCCCTTACT
 GGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTGTGCAGCCAAAACGACACCC (SEQ ID NO:128)

FIG.74A

Secuencia de aminoácidos

LVKLQESGPSLVKPSQSLTCTVTGYSITSDYAWNWI^{CDR1}RQFPGNKLEWMG^{CDR2}YISYSANTRYNPSLKS^{CDR3}RISITRDTSKNQFFLQLN
 SVTTEDTATYYCATAGRGFPYWGQGLVTVSA (SEQ ID NO:129)

FIG.72B

Cadena VL de mAb175: secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos

Secuencia de ácidos nucleicos

GACATTGTGCTGACCCAGTCTCCATCCTCCATGTCTCTATCTCTGGGAGACACAGTCAGTATCACTTGCCATTCAAGTCA
 GGACATT AACAGTAATATAGGGTGGTTCAGCAGAAACCAAGGAAATCAITTAAGGGCTGATCTATCATGGAACCAA
 CTTGGACGATGGAGTTCCATCAAGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGAGCCGATTATTCTCACCATCAGCAGCCTGGAA
 TCTGAAGATTTTGTAGACTATTACTGTGTACAGTATGGTCAGTTTCCGTGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAA
 TCAAACGG (SEQ ID NO:133)

FIG.75A

Secuencia de aminoácidos

DIVLTQSPSSMSLSLGDTVSITCHSSQDISSNIGWLQKPKGKFKGLIYHGHNLEDGVPSPRFSGSGGADYSLTSSLESEDFVD
 YYC**YQY**Q**QFP**WT**FGG**TKLEIKR (SEQ ID NO:134)
 CDR1 CDR2 CDR3

FIG.75B

Concentración volumétrica de producto y B) concentración de células viables de GS-CHO (14D8, 15B2 y 40A10) y transfectantes de hu806 GS-NS0 (36) en cultivos en matraces e agitación (100 ml) a pequeña escala. La concentración del producto se estimó mediante ELISA utilizando el anti-idiotipo 806 como anticuerpo de recubrimiento y el lote clínico ch806: J06024 como patrón

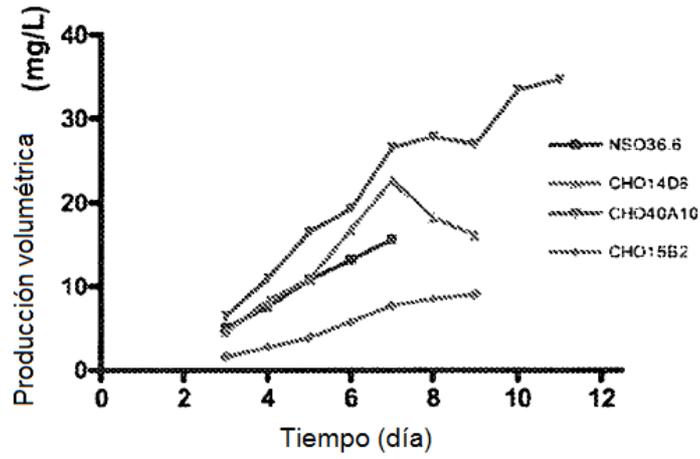


FIG.76A

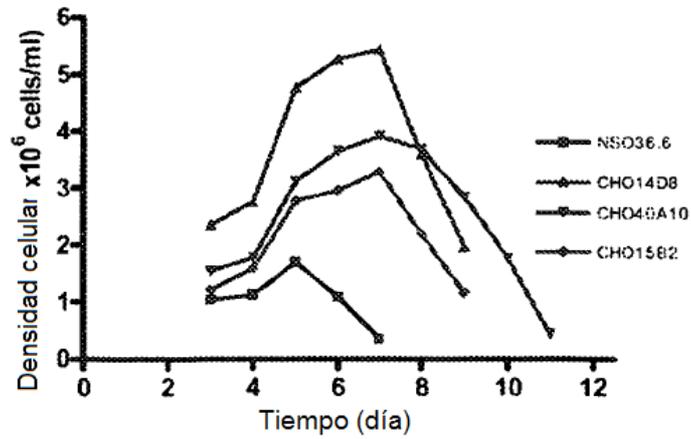


FIG.76B

Crecimiento celular y producción volumétrica de transfectante 10A10 de GS-CHO en un bioreactor de ranque agitado de 15L
 Densidad de células viables (●) y producción (▲) (mg/L) (◆) x 10⁵
 Densidad de células viables (x10⁵ células/ml)
 Viabilidad (%) (◆) y producción (▲) (mg/L)

Crecimiento celular y producción volumétrica en bioreactor de tanque agitado de 15 L

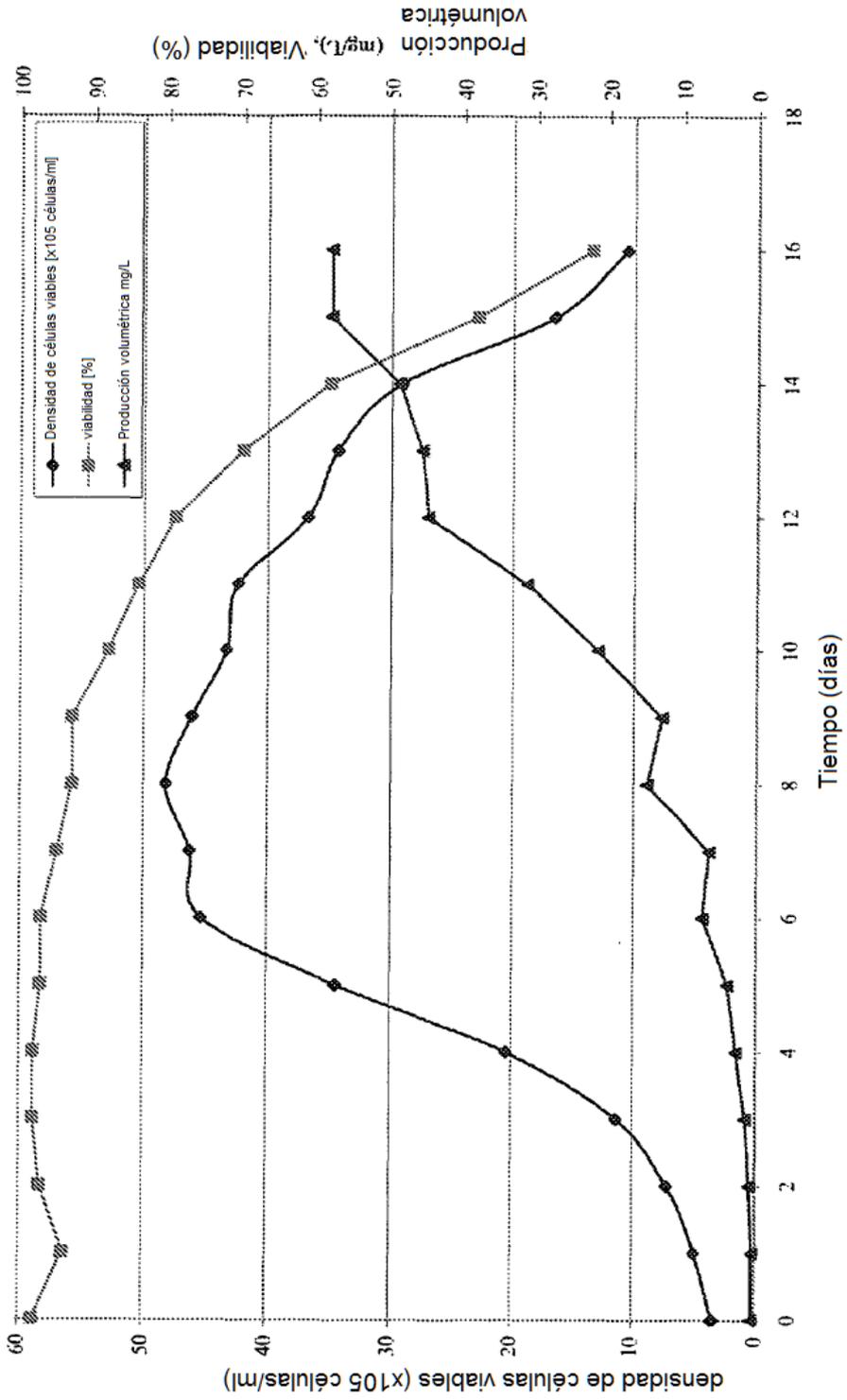


FIG.76C

Cromatografía por exclusión de tamaño (Biosep SEC-S3000) Análisis de construcciones de anticuerpo hu806 purificado con proteína A producidos en cultivo a pequeña escala y ch806 y mAb806 de control. El cromatograma a A214 nm se presenta en los paneles superiores y a A280 nm en los paneles inferiores de cada figura

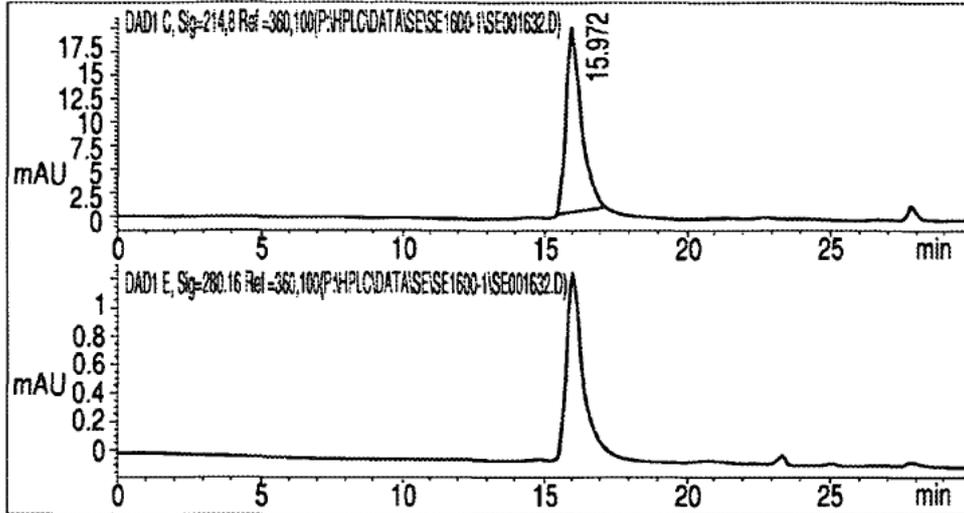


FIG. 77A

A) Control ch806,lote J06024

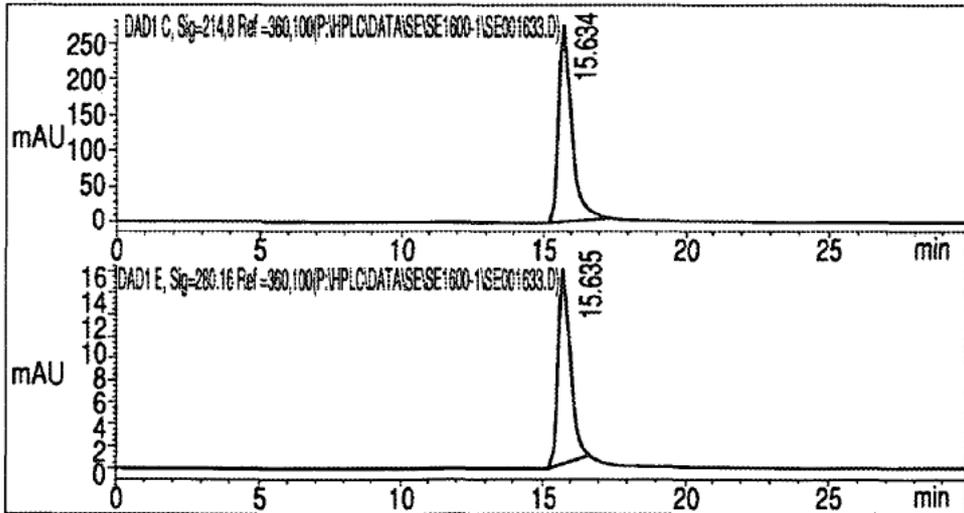


FIG. 77B

B) Control mAb806

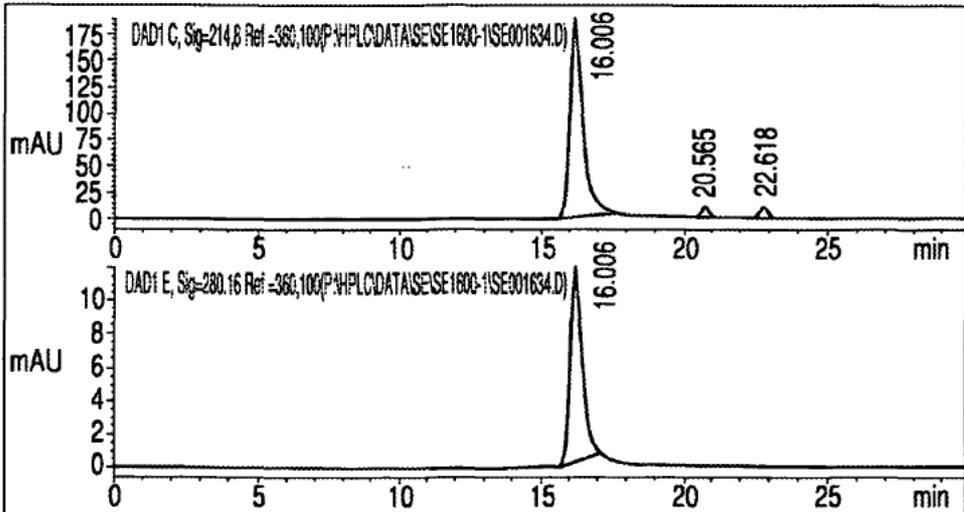
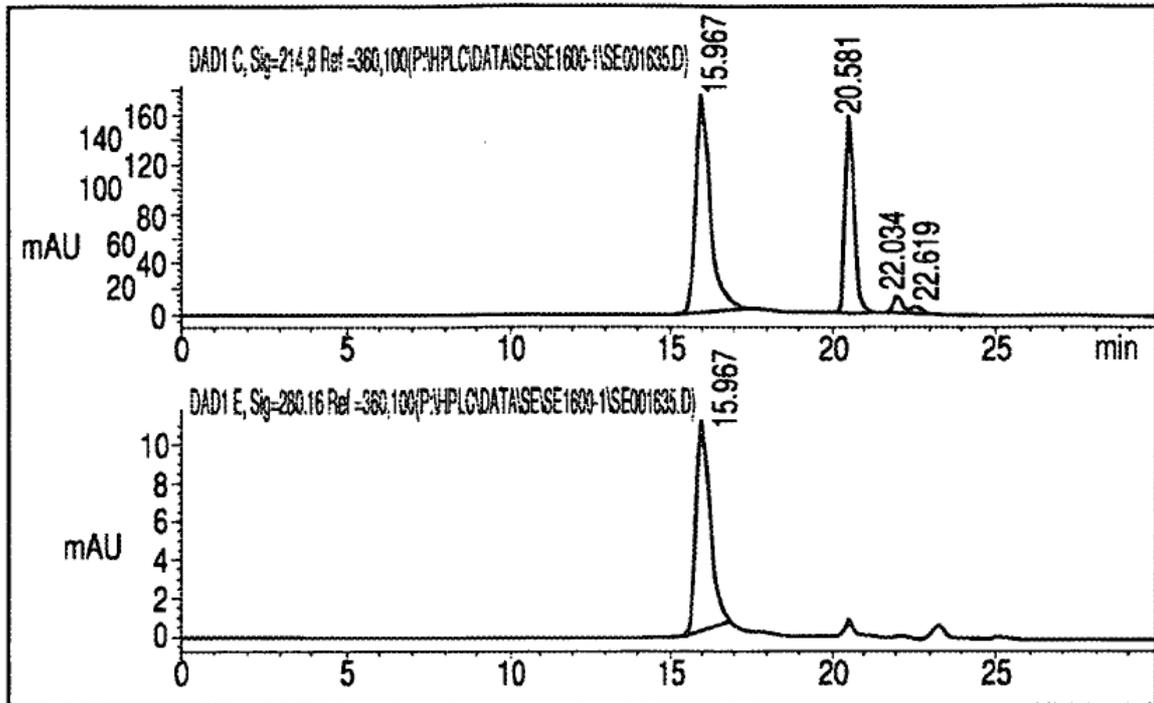


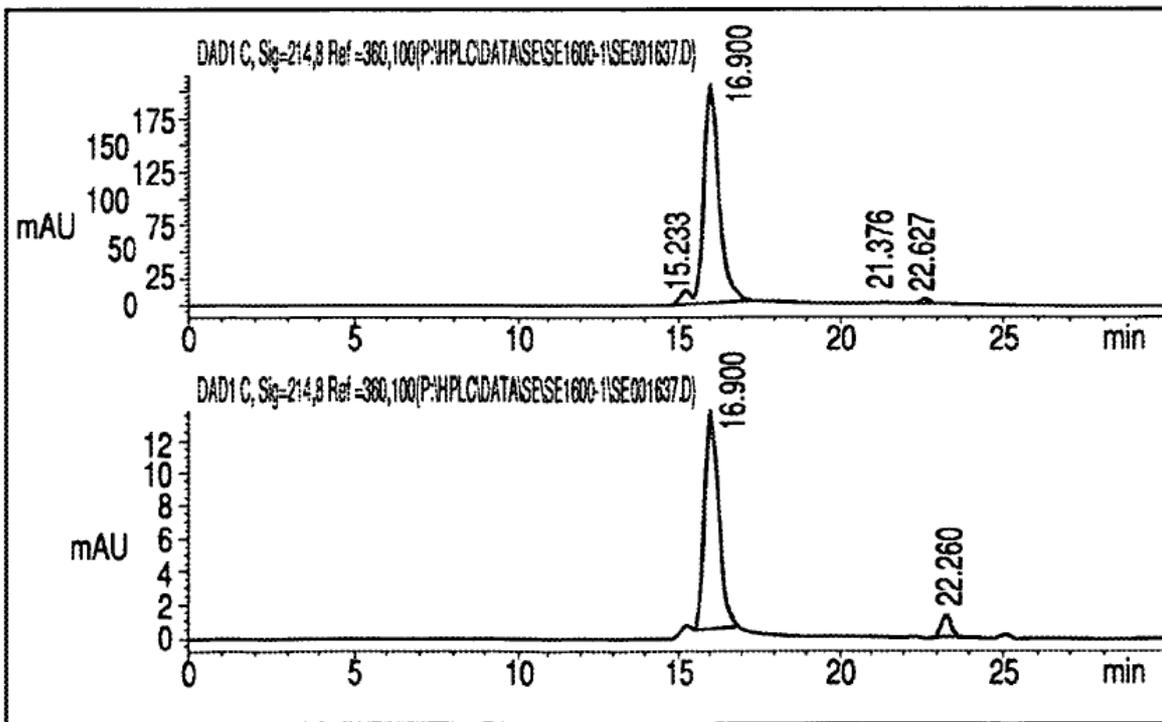
FIG. 77C

C) Producto transfectante 14D8 de hu806 de GS-CHO purificado



D). Producto transfectado 15B2 de hu806 de GS-CHO purificado

FIG. 77D



E). Producto transfectante 36 de hu806 de GS-NSO purificado

FIG. 77E

Figura 3. Cromatografía por exclusión de tamaño (Biosep SEC-S3000). Análisis de construcción 40A10 de anticuerpo hu806 purificada después de la producción a gran escala y purificación con proteína A. Cromatograma a A214nm se presente indicando el 98,85 de pureza con 1,2% de agregado presente.

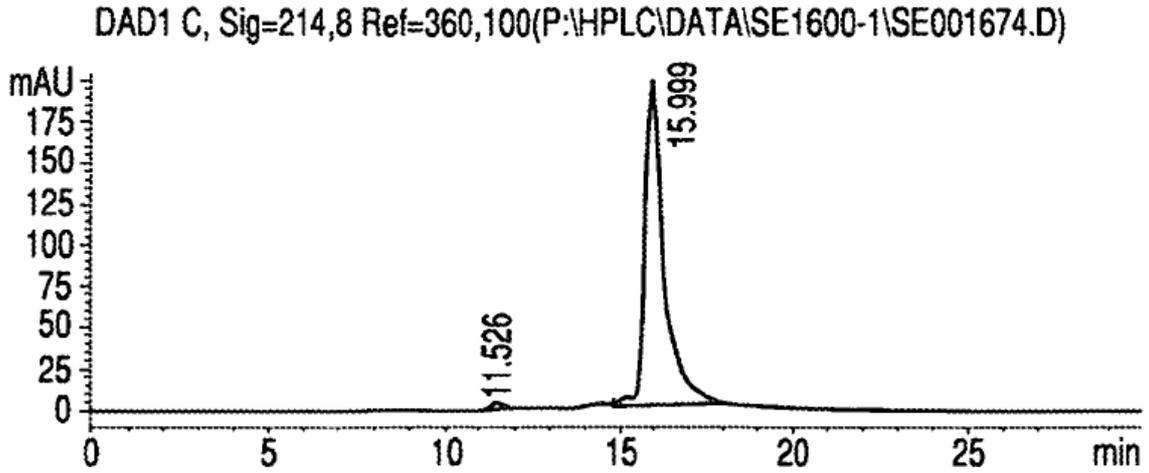


FIG. 78

Se utilizaron geles de premoldeo Tris/glicina 4-20% de Novex, Estados Unidos, en condiciones SDS-PAGE estándar para analizar las preparaciones de hu806 transfectante purificado (5 ug) GS CHO (14D8, 15B2 y 40A10) y GS-NSO (36) hu806 en condiciones reducidas. Las proteínas se detectan mediante tinción con azul Coomassie.

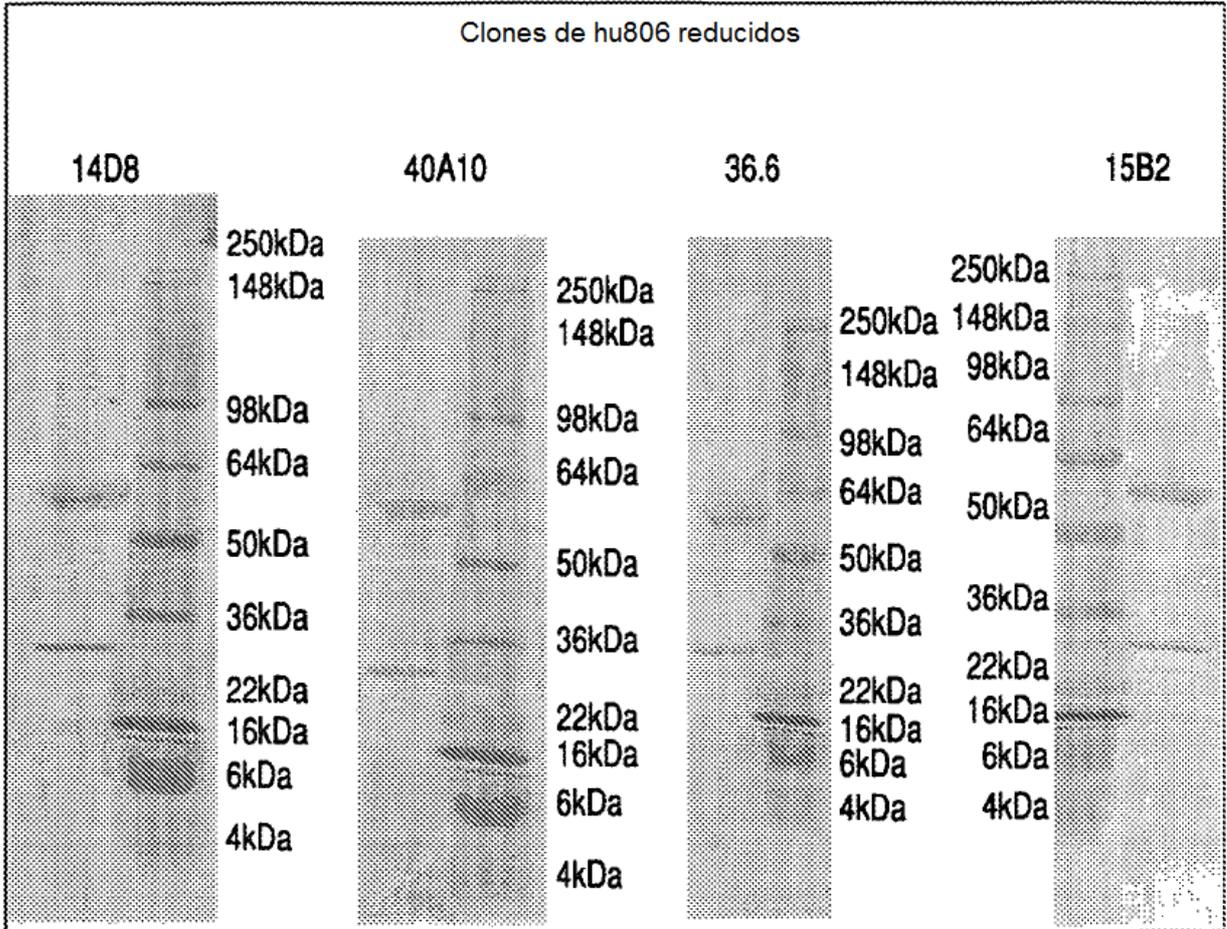


FIG. 79

Se utilizaron geles de premoldeo Tris/glicina 4-20% de Novex, Estados Unidos, en condiciones SDS-PAGE estándar para analizar las preparaciones de hu806 transfectante purificado (5 ug) GS CHO (14D8, 15B2 y 40A10) y GS-NSO (36) hu806 en condiciones no reducidas. Las proteínas se detectan mediante tinción con azul Coomassie.

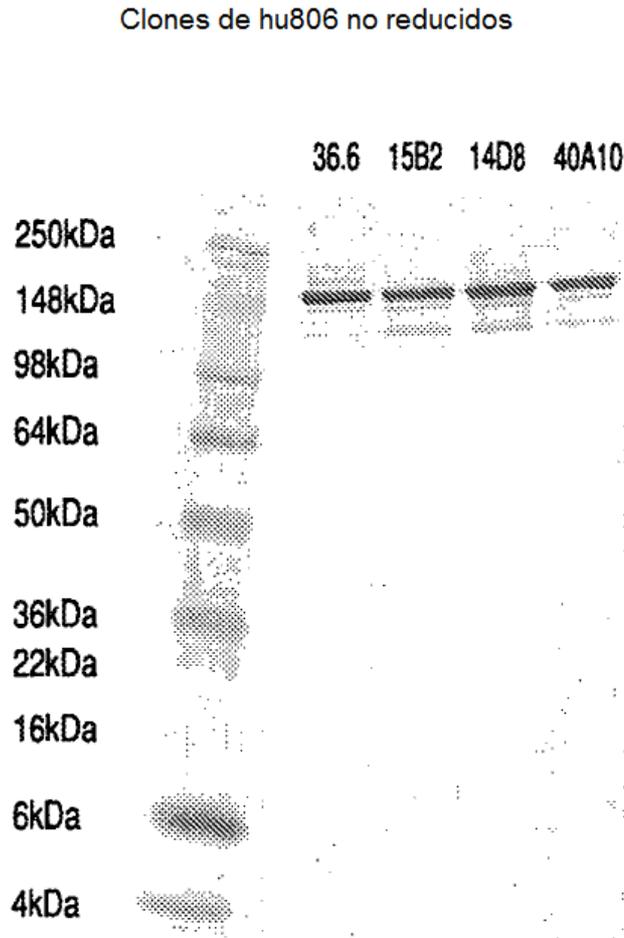


FIG. 80

Se utilizaron geles de moldeo de tris/glicina al 4-20% bajo condiciones SDS-PAGE estándar para analizar el transfectante purificado de hu806 GS CHO 40A10 (5 ug) después de de producción a gran escala. Las proteínas se detectan mediante tinción con azul coomassie.

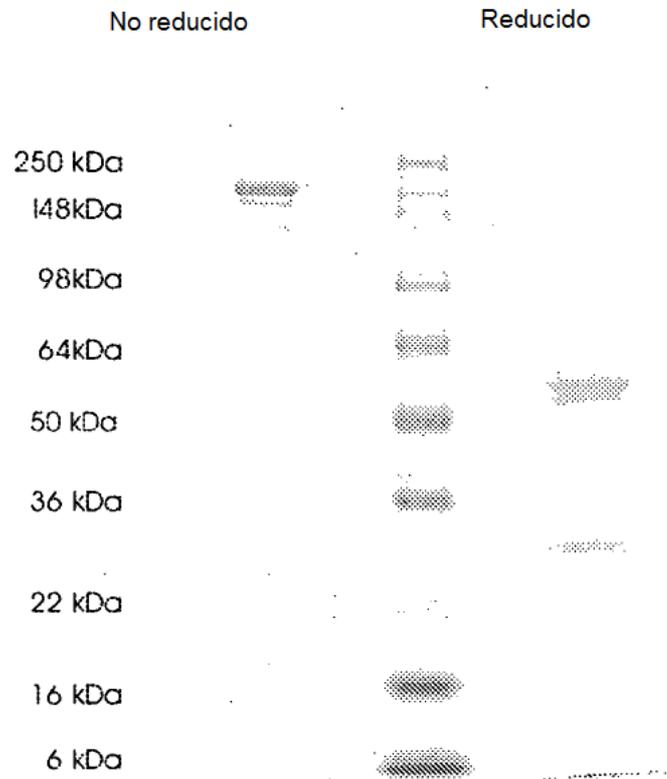


FIG.81

Análisis de gel de enfoque isoeléctrico del transfectante purificado de hu806 GS CHO 40A10 (5 ug) después de producción de 15 L. Las proteínas se detectan mediante tinción con azul Coomassie. Carril 1, marcadores pI; carril 2, hu806 (tres isoformas, pI 8,66 a 8,82); carril 3, marcadores pI

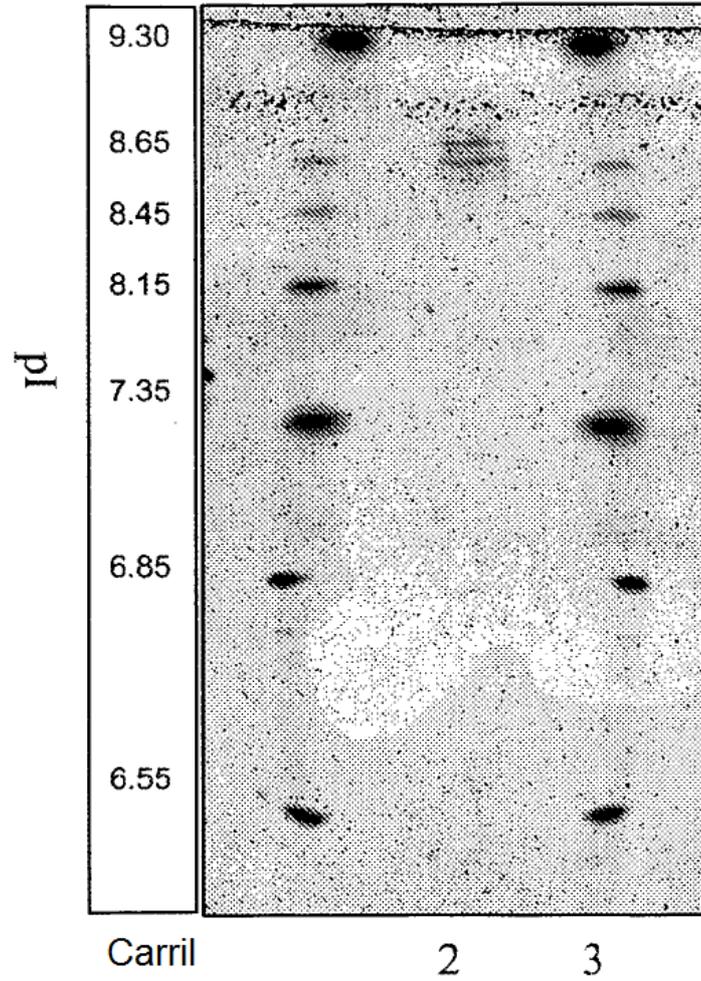


FIG.82

Unión a células 431: Análisis por citometría de flujo de preparaciones de anticuerpos hu806 purificados con proteína A (20 ug/ml) y huA33 de control de isotipo (20 ug/ml). Los controles incluyen anticuerpo secundario solo (verde) y ch806 (rojo). Las construcciones de hu806 se produjeron mediante cultivo a pequeña escala.

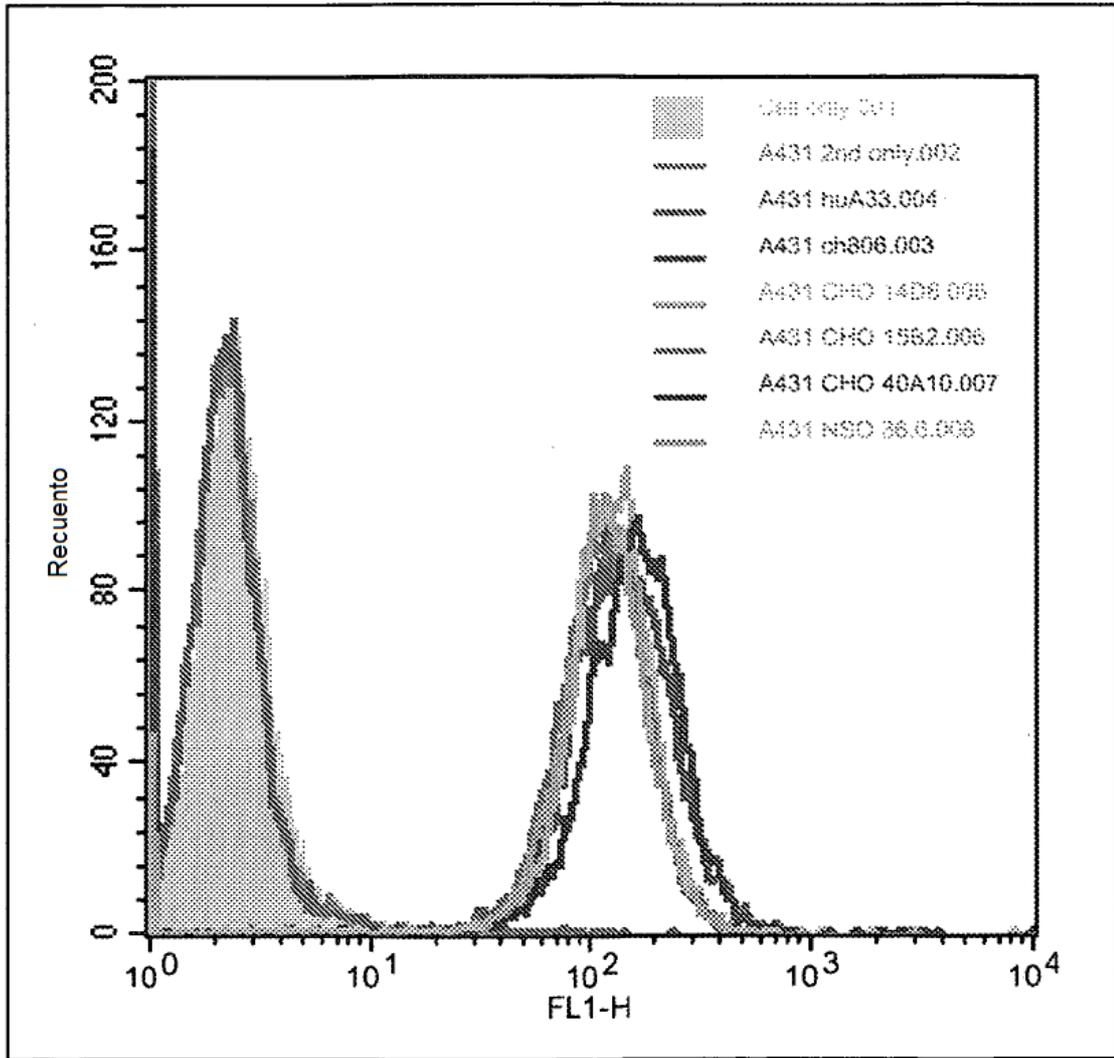


FIG.83

Unión a células 431: el análisis por citometría de flujo de preparaciones de anticuerpos 40A10 de mAb806, ch806 y hu806 purificados (20 ug/ml) que se unen a = 10% de EGFR de tipo salvaje en la superficie celular, 528 (se une a EGFR de tipo salvaje y de2-7) y anticuerpo de control irrelevante (20 ug/ml) según se indica.

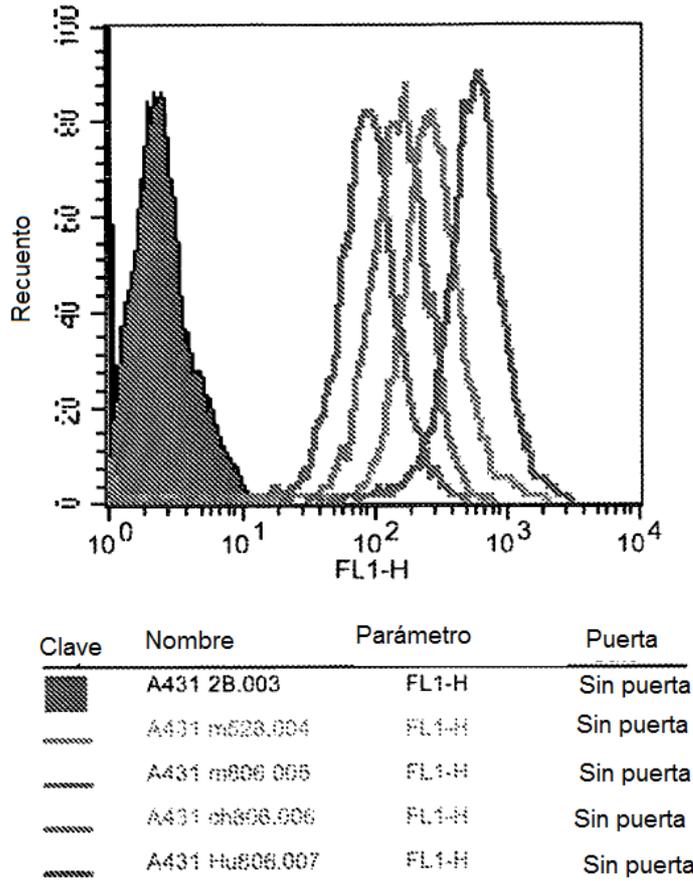
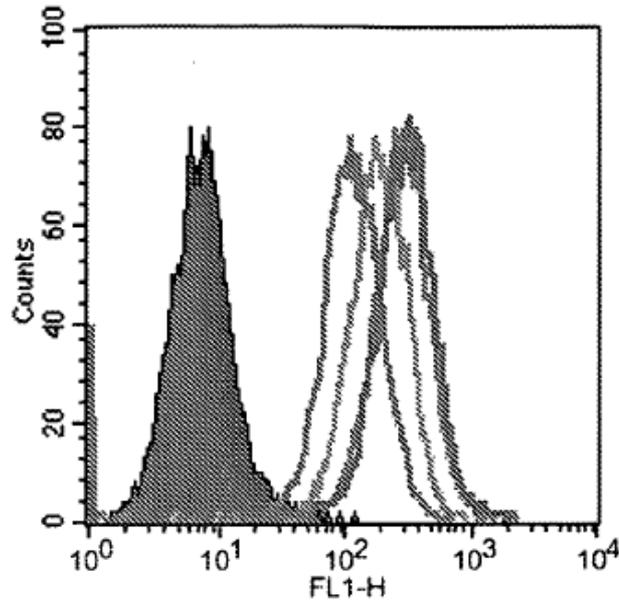


FIG.84

Unión a células de glioma U87MG.de2-7. Análisis de citometría de flujo de preparaciones de anticuerpos mAb806, ch806 y hu806 40A10 (20 ug/ml) y anticuerpo anti-EGFR 528 y de control irrelevante (20 ug/ml)



Clave	Nombre	Parámetro	Puerta
█	U87MG.d2-7 2B.009	FL1-H	Sin puerta
▒	U87MG.d2-7 m528.011	FL1-H	Sin puerta
▓	U87MG.d2-7 m806.012	FL1-H	Sin puerta
▔	U87MG.d2-7 ch806.013	FL1-H	Sin puerta
▕	U87MG.d2-7 Hu806.014	FL1-H	Sin puerta

FIG.85

unión específica de construcciones de anticuerpo 806 radiomarcado con 125I a:

A) células de glioma U87MG.de2-7 y B) células de carcinoma A431

FIG.86

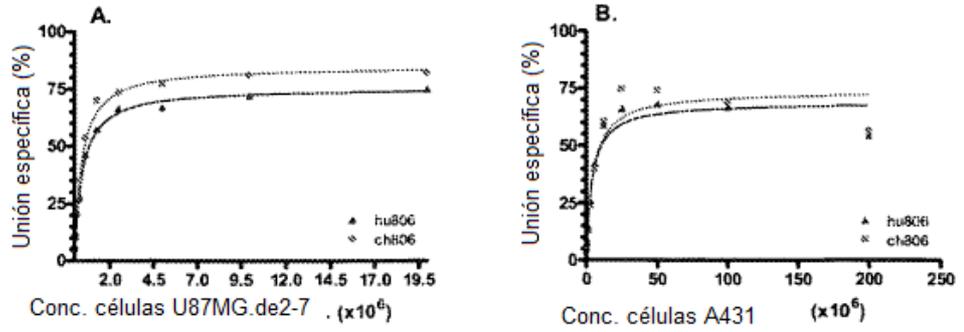


Figura 12. Análisis Scatchard: Unión de construcciones de anticuerpo A) ch806 y B) hu806 radiomarcado con 125I a células U87MG.de2-7

FIG.87

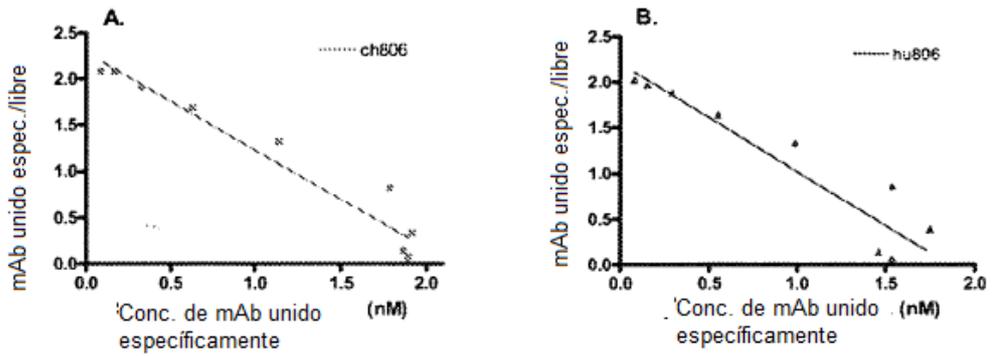
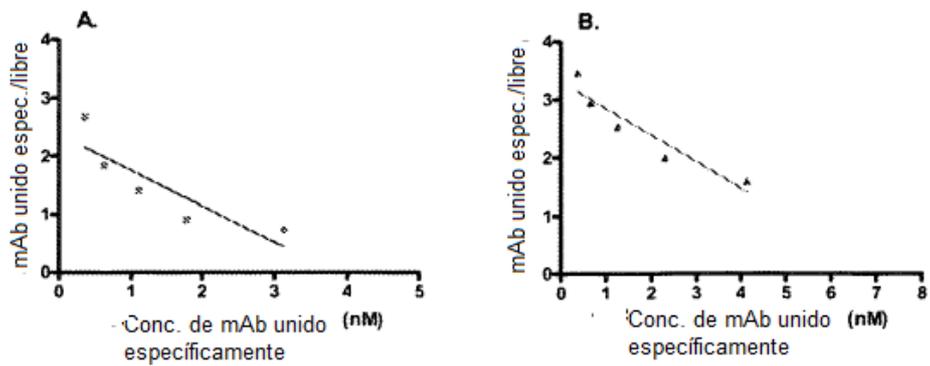


Figura 13 Análisis Scatchard: Unión de construcciones de anticuerpo A) ch806 y B) hu806 radiomarcado con 125I a células A431

FIG.88



Análisis BIAcore de unión a epítipo de péptido 806 287-302 EGFR por A) hu806 y B) ch806 que pasan sorbe el péptido inmovilizado en concentraciones crecientes de 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM y 300 nM.

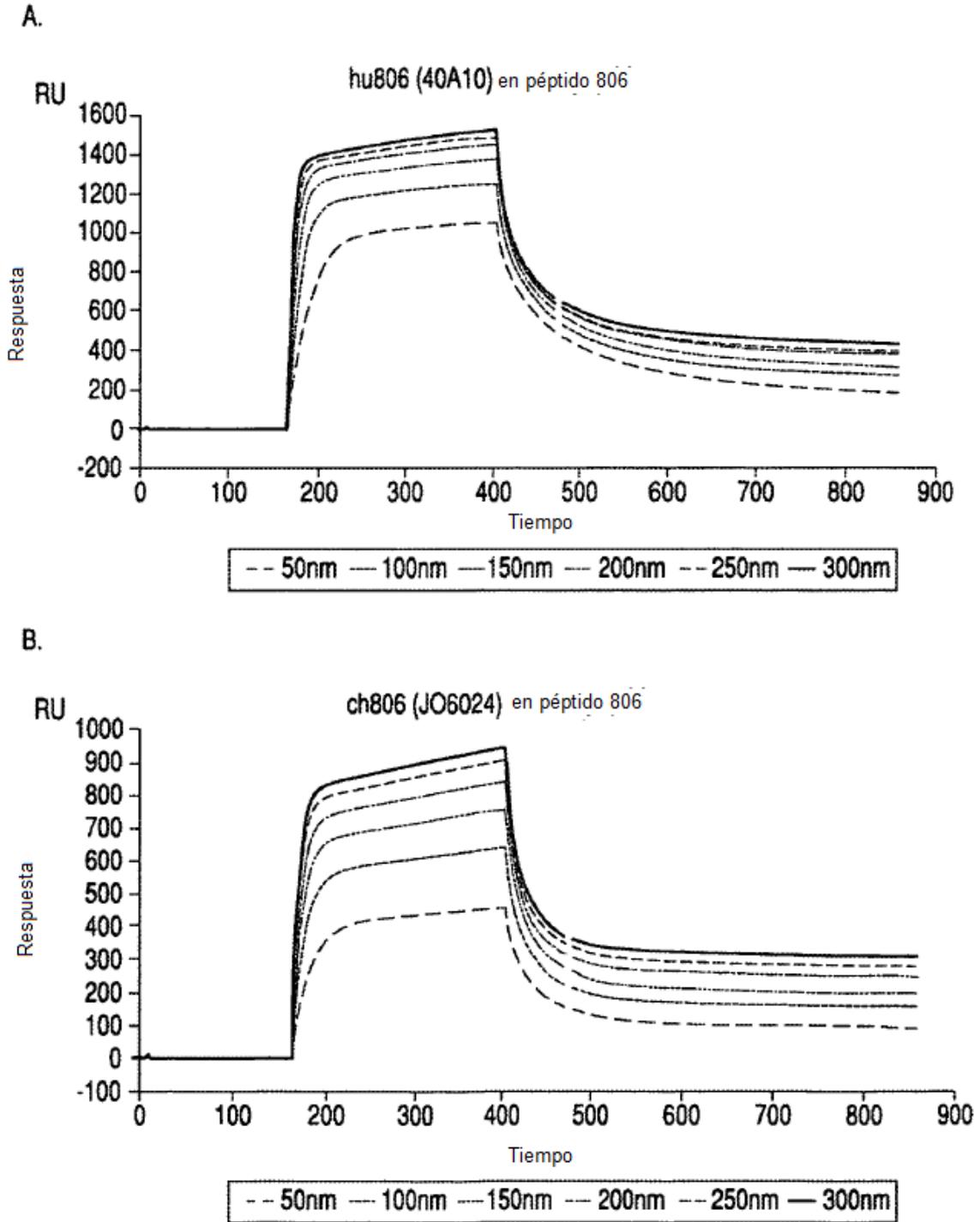


FIG. 89

Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo mediada por ch806 y hu806 en células 431 diana determinada a A) 1 ug/ml de cada anticuerpo sobre un rango de relaciones de células efectoras con respecto a células diana (E:T 0,78:1 a 100:1); B) a E:T = 50:1 sobre un rango de concentraciones de cada anticuerpo (3,15 ng/ml - 10 ug/ml) en 431 diana

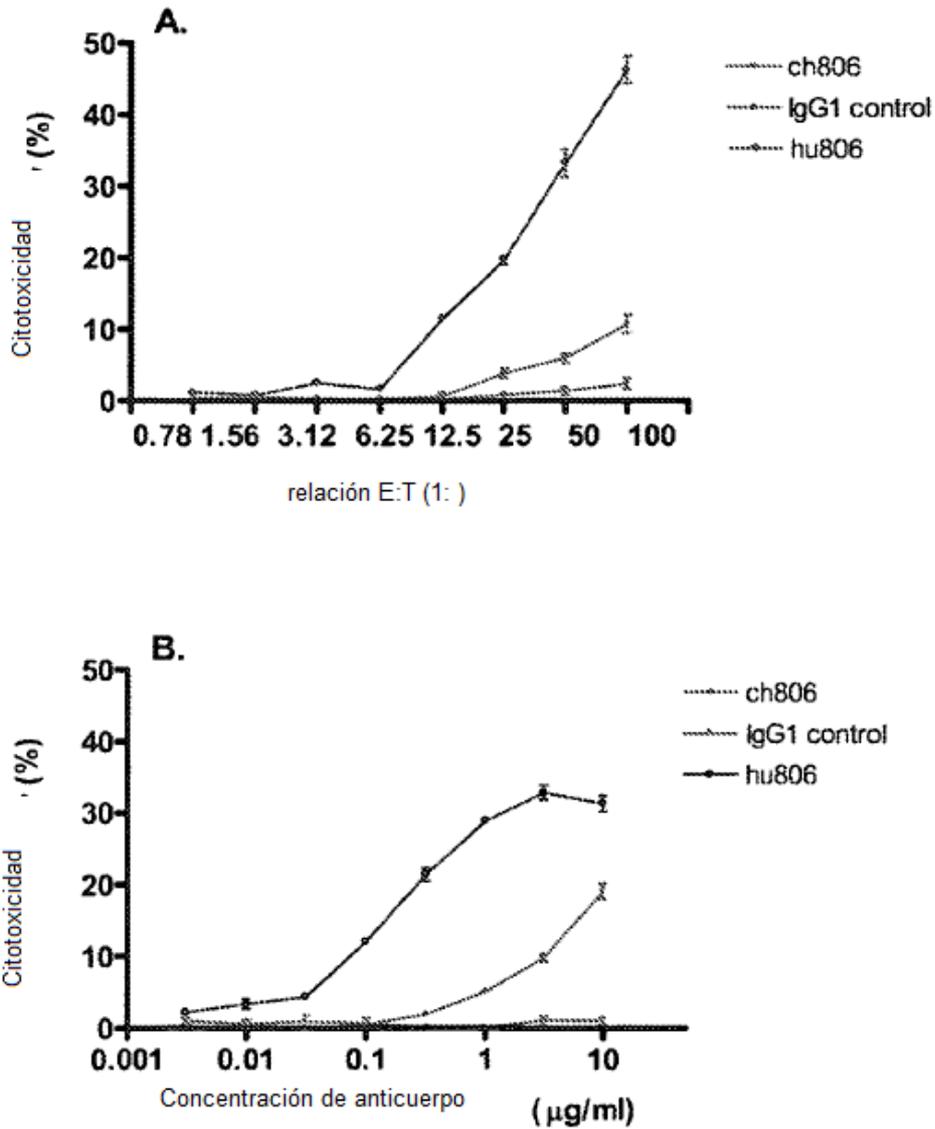


FIG.90

Tratamiento de xenoinjertos de A431 establecidos en ratones desnudos BALB/c. Grupos de 5 ratones recibieron terapia de anticuerpos con dosis de 6 x 1 mg durante 2 semanas según se indica (flechas). El promedio +/- SEM del volumen tumoral se presenta hasta la terminación del estudio

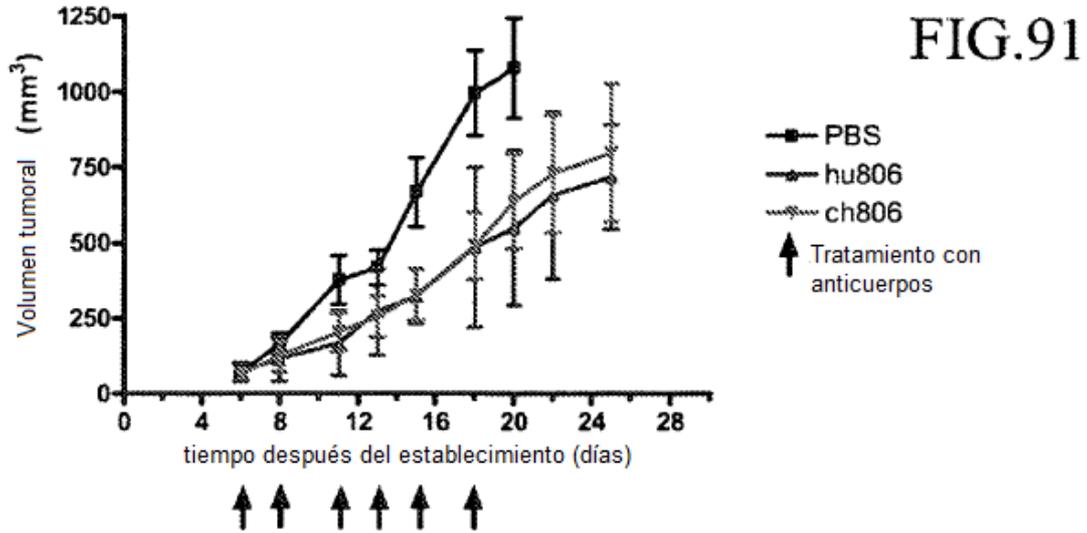
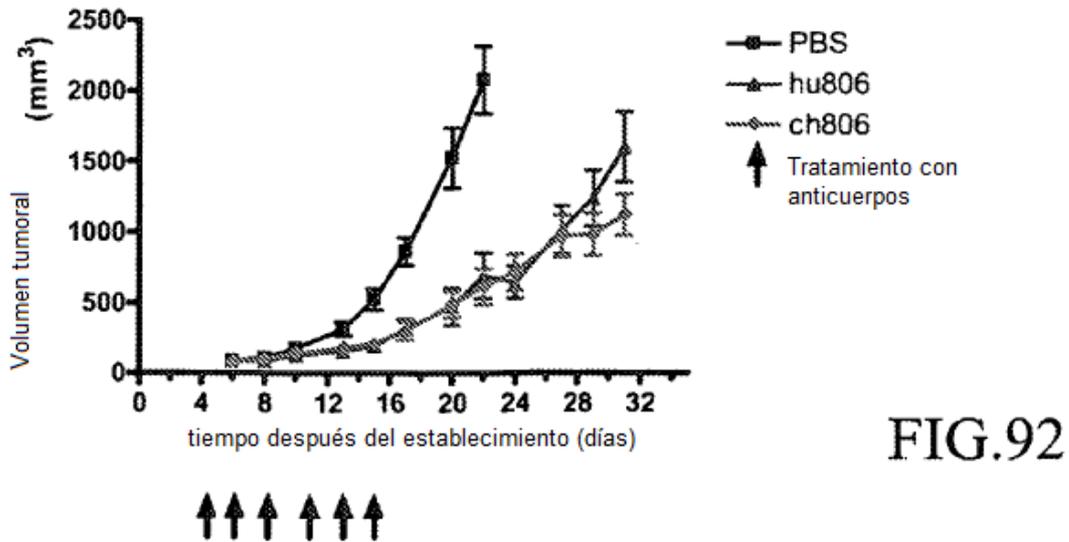


Figura 17. Tratamiento de xenoinjertos de U87MG.de2-7 establecidos en ratones desnudos BALB/c. Grupos de 5 ratones recibieron terapia de anticuerpos con dosis de 6 x 1 mg durante 2 semanas según se indica (flechas). El promedio +/- SEM del volumen tumoral se presenta hasta la terminación del estudio



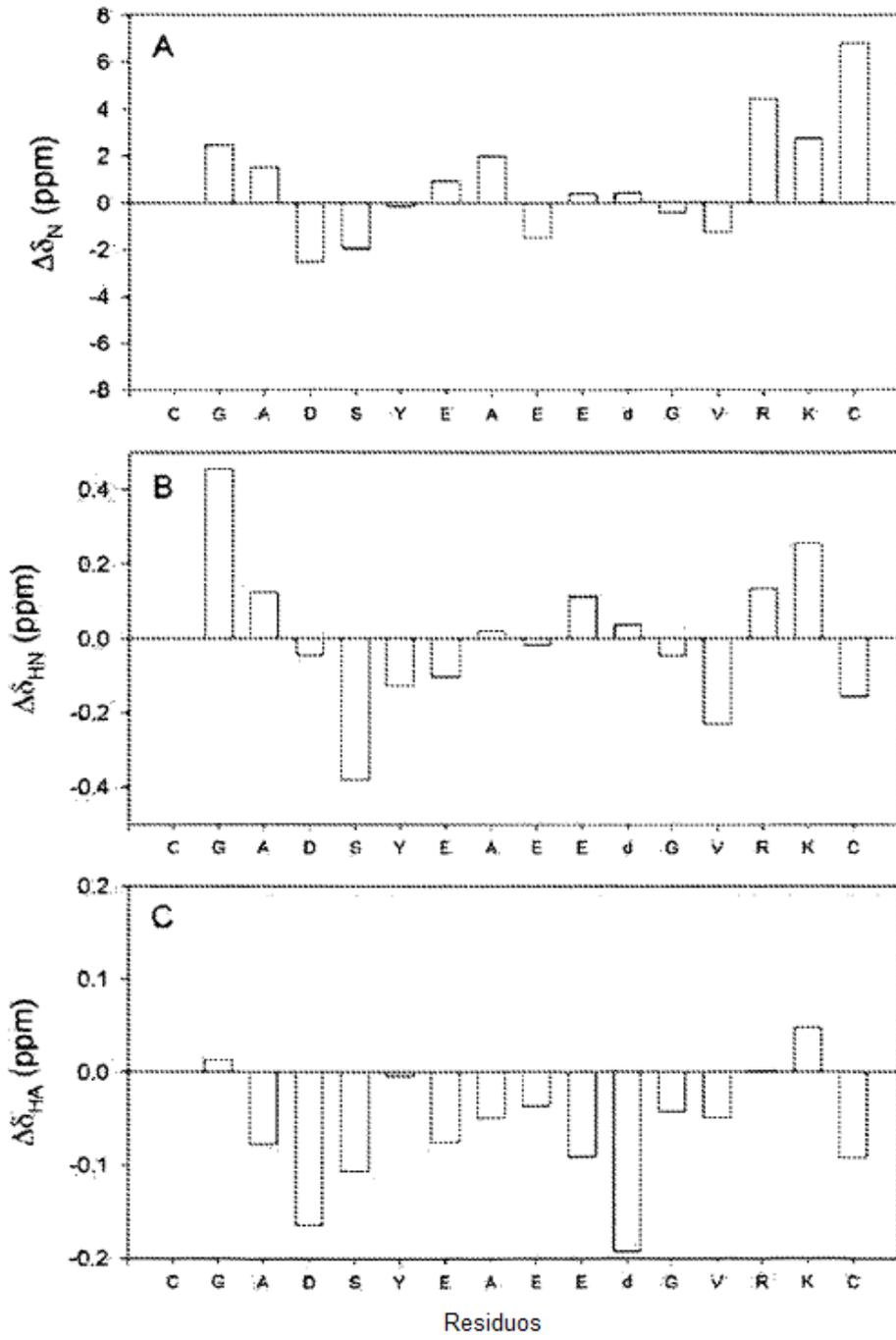


FIG.93

FIG.94C



FIG.94D

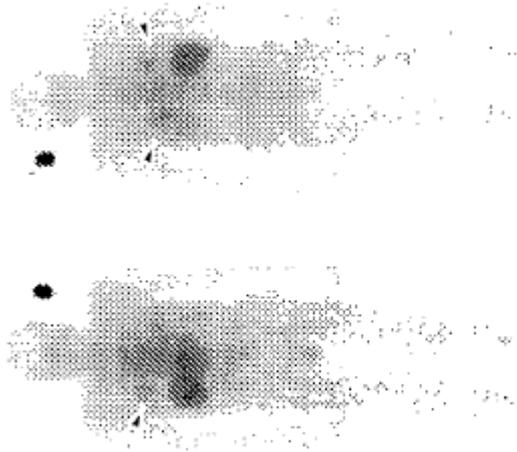


FIG.94A

FIG94B



FIG.94E



FIG.94F

FIG.95A

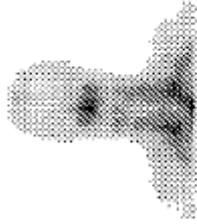


FIG.95B



FIG.95C

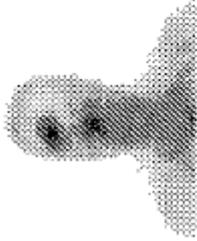


FIG.95D

FIG.95E

FIG.95F

FIG.96B

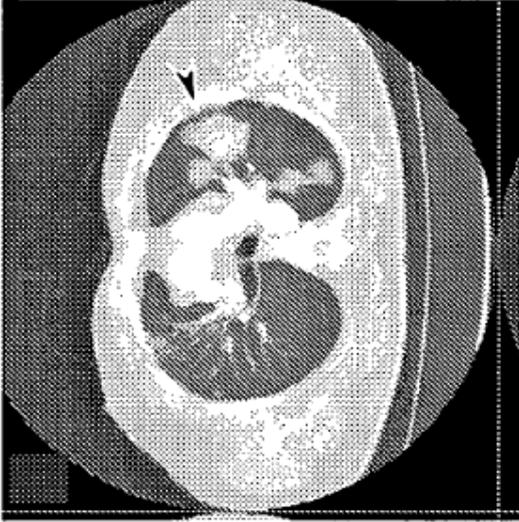


FIG.96D

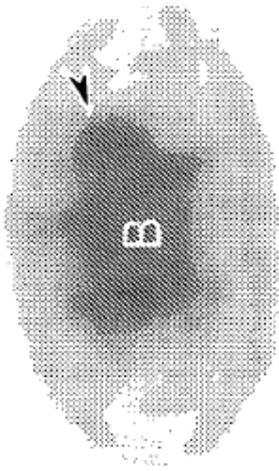
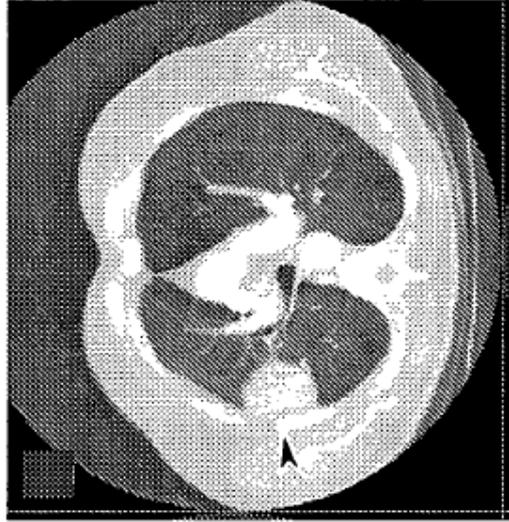


FIG.96A



FIG.96C

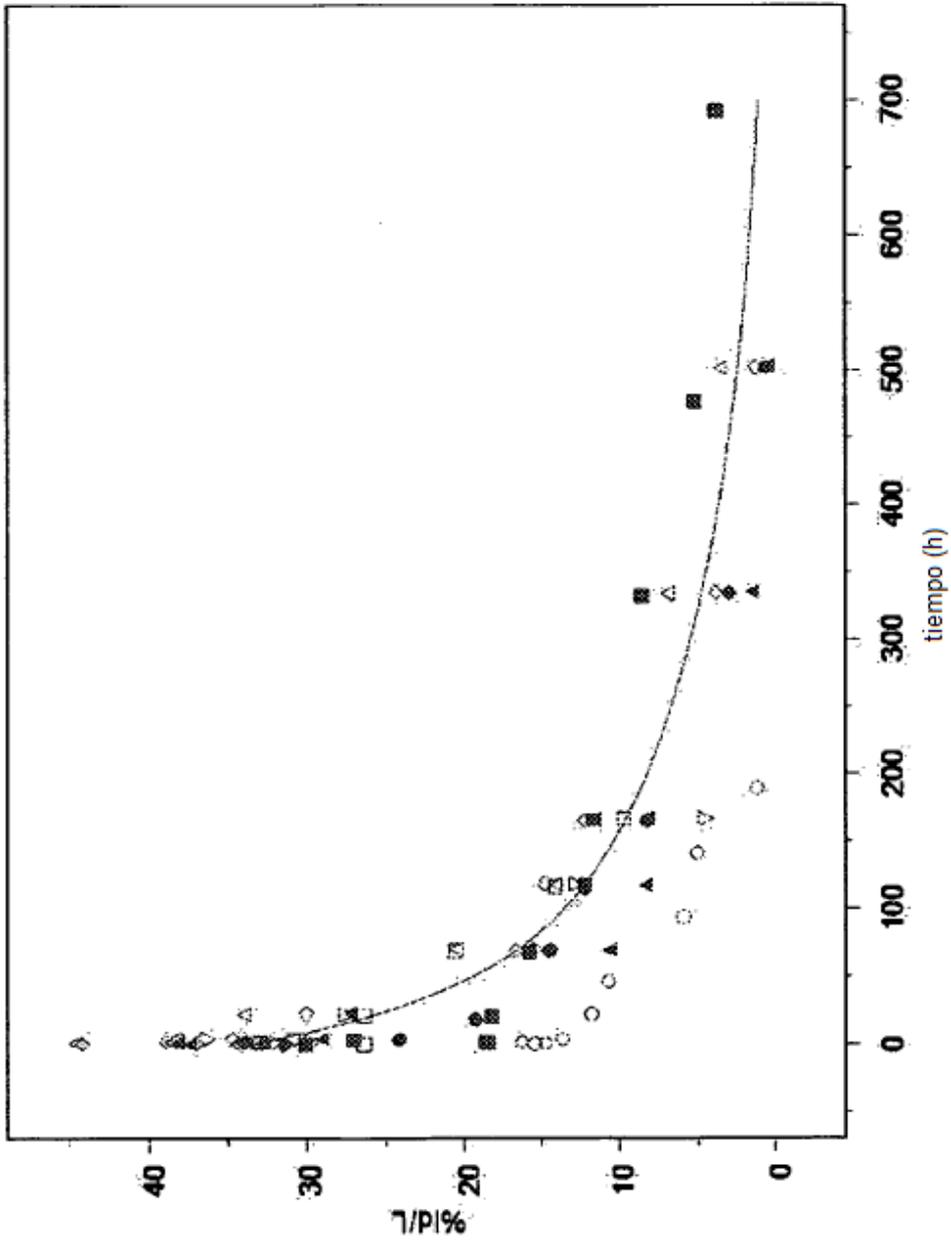


FIG.97

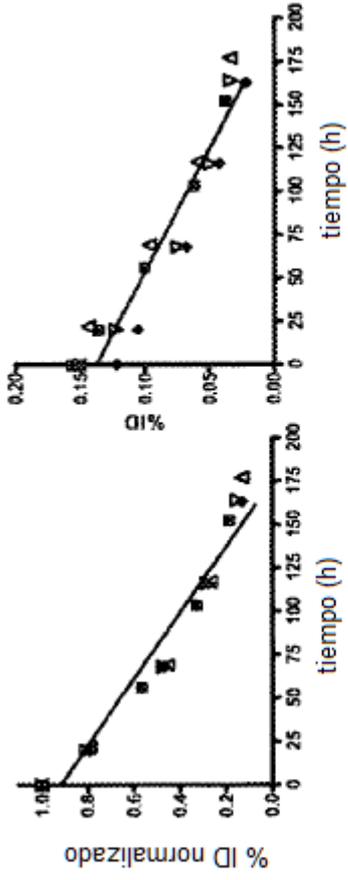


FIG.98A

FIG.98B