

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 386**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 14/71 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2008 E 08706941 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016 EP 2132229**

54 Título: **Composiciones de anticuerpos recombinantes contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico**

30 Prioridad:

01.03.2007 DK 200700317

05.03.2007 US 904773 P

10.07.2007 DK 200701016

11.07.2007 US 929727 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.09.2016

73 Titular/es:

SYMPHOGEN A/S (100.0%)

Pederstrupvej 93

2750 Ballerup, DK

72 Inventor/es:

PEDERSEN, MIKKEL WANDAHL;

STEINAA, LUCILLA;

JENSEN, ALLAN;

KOEFOED, KLAUS;

MEIJER, PER-JOHAN;

CARLSSON, ROBERT;

PYKE, CHARLES y

NIELSEN, LARS SOEGAARD

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 582 386 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

Composiciones de anticuerpos recombinantes contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico

5 Campo de la invención

La invención está relacionada con el campo de anticuerpos recombinantes para su uso en carcinoterapia humana.

Antecedentes de la invención

10 El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, acrónimo de *Epidermal Growth Factor Receptor*) desempeña una función importante en la proliferación celular así como en la apoptosis, angiogénesis y propagación metastásica, procesos que son cruciales para la progresión tumoral (Salomon *et al.*, Crit. Rev. Oncology/Haematology, 19: 183-232 (1995); Wu *et al.*, J. Clin. Invest., 95: 1897-1905 (1995); Karnes *et al.*, Gastroenterology, 114: 930-939 (1998); Woodburn *et al.*, Pharmacol. Therap. 82: 241-250 (1999); Price *et al.*, Eur. J. Cancer, 32A: 1977-1982 (1996)). De hecho, estudios realizados han mostrado que el crecimiento celular mediado por EGFR está incrementado en diversos tumores sólidos, incluyendo cáncer pulmonar no microcítico, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer gástrico y tumores de cabeza y cuello (Salomon DS *et al.*, Critical Reviews in Oncology/Haematology, 19: 183-232 (1995)). Adicionalmente, ahora se sabe que la excesiva activación del EGFR en la superficie de las células cancerosas está asociada con enfermedad avanzada, con el desarrollo de un fenotipo metastásico y con un mal pronóstico en pacientes con cáncer (Salomon DS *et al.*, Critical Reviews in Oncology/Haematology 19: 183-232 (1995)).

25 Asimismo, la expresión de EGFR viene frecuentemente acompañada por la producción de ligandos de EGFR, TGF-alfa y EGF, entre otros, por células tumorales que expresan EGFR lo que sugiere que en la progresión de estas células participa un bucle autocrino (Baselga, *et al.* (1994) Pharmac. Therapeut. 64: 127-154; Modjtahedi, *et al.* (1994) Int. J. Oncology. 4: 277-296). Por lo tanto, el bloqueo de la interacción entre dichos ligandos de EGFR y EGFR puede inhibir el crecimiento y la supervivencia de tumores (Baselga, *et al.* (1994) Pharmac. Therapeut. 64: 127-154).

30 El EGFR es una glucoproteína unida a la membrana con un peso molecular de aproximadamente 170 kDa. El EGFR consta de un dominio de unión a ligando externo glucosilado (621 restos) y de un dominio citoplasmático (542 restos) conectados mediante un corto enlazador transmembrana de 23 aminoácidos. La parte extracelular del EGFR contiene 25 enlaces disulfuro y 12 sitios de glucosilación ligados a N, y se considera generalmente que consta de cuatro subdominios. Las estructuras cristalinas de rayos X del EGFR sugieren que el receptor adopta una conformación fija autoinhibida que no puede unirse a EGF (Ferguson *et al.*, Mol Cell, 2003, vol 11: 507-517) y una conformación activa que puede mediar la unión de ligando de EGF y la dimerización del receptor (Garret *et al.*, Cell 2002, vol 110: 763-773; Ogiso *et al.*, Cell, 2002, vol 110: 775-787). En particular, se ha sugerido que el dominio I y el dominio III proporcionan contribuciones aditivas para la formación de un sitio de unión a ligando de alta afinidad. Los dominios II y IV son regiones de tipo laminina ricas en cisteína que estabilizan el plegamiento de las proteínas y que contienen una posible interfaz de dimerización del EGFR.

45 Se sabe que el EGFR existe en diversas conformaciones diferentes en la superficie celular, donde la conformación fija o inmovilizada es la más frecuente. La conformación fija no puede formar dímeros y por tanto es inactiva. Se sabe que el anticuerpo terapéutico Erbitux estabiliza la conformación fija a través de la unión con el dominio III y obstaculizando estéricamente que el receptor alcance el estado no fijo (libre). Sin embargo, algunos receptores tienen aún la capacidad de adoptar la conformación libre, de unirse al ligando y de formar dímeros. Típicamente, un anticuerpo monoclonal (mAb, *monoclonal antibody*) solo será eficaz en la unión contra una de las conformaciones y por lo tanto no puede dirigirse eficazmente a células cancerosas que presentan otras conformaciones o a células cancerosas que presentan diversas conformaciones.

Los anticuerpos monoclonales (mAb) dirigidos al dominio de unión a ligando de EGFR pueden bloquear la interacción con ligandos de EGFR y, simultáneamente, la ruta de señalización intracelular resultante.

55 Erbitux™ (Cetuximab) es un anticuerpo monoclonal quimérico de ser humano/ratón recombinante que se une específicamente al dominio extracelular de (EGFR) humano. Erbitux se compone de las regiones Fv de un anticuerpo contra EGFR murino con regiones constantes de cadena pesada y ligera kappa de IgG1 humana y tiene un peso molecular aproximado de 152 kDa. Erbitux se produce en cultivo de células de mamífero (mieloma murino). Erbitux está probado para el tratamiento de pacientes con cáncer colorrectal metastásico y cuyos tumores expresan EGFR. Además, Erbitux se usa en combinación con radioterapia para tratar a pacientes con cáncer de células escamosas de la cabeza y del cuello que no pueden extirparse por cirugía o como un tratamiento de segunda línea del cáncer de células escamosas de la cabeza y del cuello donde la terapia convencional basada en platino ha fracasado.

65 Vectibix™ (panitumumab) es un anticuerpo monoclonal kappa IgG2 humano, recombinante que se une específicamente al EGFR humano. Vectibix tiene un peso molecular aproximado de 147 kDa. Panitumumab se

produce en células de mamífero (Ovario de Hámster Chino) modificadas por ingeniería genética. Vectibix está aprobado para el tratamiento de pacientes con cáncer colorrectal metastásico y cuyos tumores expresan EGFR con progresión de la enfermedad o que siguen regímenes de quimioterapia que contienen fluoropirimidina, oxaliplatino e irinotecán.

5 Se han identificado diversos receptores de EGF mutantes en células de tumor humano. Estos pueden hacer que el receptor se active independientemente de la unión al ligando (EGFRvIII) conduciendo a una tumorigenicidad potenciada. Pueden generarse anticuerpos monoclonales contra un EGFR mutante, pero dicho anticuerpo monoclonal no será necesariamente eficaz contra un EGFR no mutado.

10 Se han identificado mutaciones del EGFR en pacientes con cáncer humano que afectan su respuesta a la quimioterapia dirigida contra EGFR. El documento WO 2006/110478 (Novartis) desveló 43 mutaciones, así como 18 SNP (*single nucleotide polymorphism*, polimorfismos mononucleotídicos) en la fase de lectura abierta del EGFR. Se identifican algunas mutaciones de sentido erróneo en dos o más tipos de tumores. El documento WO 2006/091899 (Amgen) desveló ocho mutaciones adicionales identificadas en diversas células cancerosas. Una o más de estas mutaciones pueden localizarse en el epítipo o afectar a la estructura del epítipo unido por uno de los anticuerpos monoclonales actualmente aprobados. Los pacientes portadores de dicha mutación (o mutaciones) no podrán tratarse con un anticuerpo monoclonal.

20 Asimismo, hay informes en la bibliografía que muestran heterogeneidad en la glucosilación de al menos uno de los sitios de glucosilación (Whitson *et al.*, 2005 *Biochemistry* 44: 14920-31; Zhen *et al.* 2003 *Biochemistry* 42; 5478-92). Dicha heterogeneidad puede dar como resultado, de un modo directo o indirecto, la exposición diferencial de epítipos que varía entre las células tumorales.

25 La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, *antibody dependent cellular cytotoxicity*) es un mecanismo alternativo mediante el cual los anticuerpos actúan como mediadores en la destrucción de las células tumorales. El nivel de ADCC depende de diversos factores incluyendo el subtipo de IgG (IgM>IgG1>IgG2), la densidad de anticuerpos en las células diana, el patrón de glucosilación del anticuerpo así como de las propiedades de la propia diana.

30 Friedmann *et al* (PNAS 2005, 102: 1915-1920) han mostrado que dos anticuerpos monoclonales murinos seleccionados por su capacidad para inhibir la unión de EGF con EGFR a través de la unión con distintos epítipos de EGF, pueden regular negativamente de un modo sinérgico la expresión del receptor en células KB y en células CHO que expresan de un modo transitorio EGFR. Los anticuerpos que inhibían el EGF competitivo en cruzado no presentaron ninguna sinergia.

35 Modjtahedi *et al* (Cell Biophysics vol 22, 1993, 129-146) han ensayado combinaciones de varios anticuerpos contra EGFR de rata con epítipos no solapantes. Los anticuerpos eran de isotipos diferentes. En todos los casos, el efecto de usar dos anticuerpos fue intermedio entre los efectos de usar cantidades similares de los dos anticuerpos monoclonales en solitario. Esto se confirmó tanto *in vitro* como *in vivo*.

40 El documento WO 2004/032960 (Patente de Merck) desvela que el uso combinado de dos anticuerpos monoclonales, Mab425 y Mab225 (Cetuximab) produce una cantidad aumentada de anticuerpos unidos a la superficie de células cancerosas que expresan EGFR en comparación con una cantidad similar de cada uno de los anticuerpos monoclonales en solitario. La publicación también desvela la regulación negativa aumentada de EGFR cuando se usa la combinación de anticuerpos en comparación con los dos anticuerpos monoclonales.

45 Perera *et al* (Clin Cancer Res 2005; 11(17): 6390-99) desvelaron un efecto sinérgico de tratamiento de ratones portadores de xenoinjertos U87MG.de2-7 (delección de exones 2-7) con una combinación de dos anticuerpos monoclonales murinos. Uno de los anticuerpos (mAb 528) se une a todos los subtipos de EGFR con especificidad similar a la de cetuximab. El otro (mAB 806) sólo se une a EGFR de2-7. La línea celular U87MG.de2-7 es una línea celular transfectada de EGFR de2-7. La línea celular U87MG.DK expresa una quinasa inactiva variante de EGFR de2-7. No se observó sinergia cuando los dos anticuerpos se usaron contra ratones portadores de xenoinjertos U87MG.DK. En un modelo de xenoinjerto con la línea celular A431 que expresa EGFR de tipo silvestre, los autores no proporcionaron pruebas de sinergia. El EGFR de2-7 solo está presente en un número limitado de tipos de cáncer, tal como glioma, hasta cierto grado cáncer de mama y cánceres de pulmón.

50 Aunque estos estudios han indicado que, en algunos casos, puede existir sinergia entre dos anticuerpos monoclonales murinos, también muestran que, en muchos casos, no se observa sinergia. Los estudios tampoco proporcionan una composición de anticuerpos contra EGFR que sea eficaz contra una gran variedad de líneas de células de cáncer clínicamente relevantes.

55 Por consiguiente, se necesitan anticuerpos terapéuticos mejorados contra EGFR que sean eficaces en el tratamiento y/o en la prevención de enfermedades relacionadas con la sobreexpresión de EGFR cuando se administren a dosis bajas. También se necesitan anticuerpos terapéuticos contra el cáncer, ampliamente aplicables, que puedan usarse

65

sin poseer un conocimiento detallado sobre la estructura de EGFR expresado por las células cancerosas en cuestión.

Sumario de la invención

5 La invención se refiere a una composición de anticuerpos que comprende una primera molécula de anticuerpo contra EGFR humano y una segunda molécula de anticuerpo contra EGFR humano distinta, en la que:

10 a) la primera molécula de anticuerpo contra EGFR comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada en la SEQ ID NO: 40 y las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera en la SEQ ID NO: 72; y

15 b) la segunda molécula de anticuerpo contra EGFR comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada en la SEQ ID NO: 41 y las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera en la SEQ ID NO: 73.

20 Adicionalmente, la invención se refiere a una molécula de unión biespecífica que se une a EGFR, en la que un primer sitio de unión a antígeno de la molécula comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada en la SEQ ID NO: 40 y las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera en la SEQ ID NO: 72, y un segundo sitio de unión a antígeno de la molécula comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada en la SEQ ID NO: 41 y las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera en la SEQ ID NO: 73.

25 Adicionalmente en el presente documento se describe una composición de anticuerpos recombinantes que comprende al menos 3 moléculas de anticuerpo contra EGFR distintas, en la que los anticuerpos se unen a distintos primer, segundo y tercer epítomos de EGFR.

30 También se describe una composición de anticuerpos recombinantes que comprende al menos dos moléculas de anticuerpo contra EGFR distintas, en la que una molécula de anticuerpo contra EGFR distinta se selecciona del grupo que consiste en los anticuerpos: 1030, 1042, 1208, 1229, 1254, 1257, 1260, 1261, 1277, 1284, 1308, 1320, 1344, y 1347 o anticuerpos que tienen las CDR de estos anticuerpos.

35 Al menos una molécula de anticuerpo contra EGFR distinta como se describe en el presente documento puede seleccionarse del grupo que consiste en los anticuerpos 1030, 1347, 1277, 1254, 1320, 1260, 1261 y 1284 o anticuerpos que tienen las CDR de estos anticuerpos. En una realización particularmente preferida de la invención, la composición de anticuerpos comprende los anticuerpos 992 y 1024 o dos anticuerpos basados en sus secuencias de CDR, o en sus secuencias de VL y VH.

40 Las composiciones de anticuerpos representativas de la invención han demostrado ser eficaces en la inhibición de la proliferación de líneas de células de cáncer representativas, lo que es indicativo de un uso *in vivo* en el tratamiento del cáncer. Estos resultados se han confirmado en un ensayo con esferoides de células de cáncer, que puede ser más representativo de la situación *in vivo*, donde las células de cáncer forman tumores. Asimismo, una composición de anticuerpos de la invención parece reducir la motilidad celular de los esferoides de cáncer y por tanto reduce la tendencia a formar metástasis. La eficacia *in vivo* en un modelo de xenoinjerto también se ha demostrado con una composición de anticuerpos representativa. Estos resultados se han confirmado con una composición de anticuerpos particularmente preferida que consiste en los anticuerpos 992 y 1024.

50 En un modelo de xenoinjerto de cáncer humano en ratones, una composición de anticuerpos representativa de la invención ha dado como resultado un grado significativamente más alto de diferenciación terminal de las células tumorales en comparación con los anticuerpos monoclonales disponibles en el comercio, Vectibix y Erbitux. Parece que la composición de anticuerpos preferida de la invención actúa a través de un mecanismo de acción diferente en comparación con los anticuerpos monoclonales, ya que no se observa nuevo crecimiento tumoral después de finalizar el tratamiento con la composición de anticuerpos de la invención. El nuevo crecimiento tumoral se observa después de finalizar el tratamiento con los anticuerpos monoclonales.

55 En estudios de unión, los autores de la invención han demostrado que algunos de los anticuerpos proporcionados parecen facilitar la unión de anticuerpos adicionales, aumentando de este modo la cantidad total de anticuerpos unidos al receptor. También se ha demostrado que la unión de tres anticuerpos de dominio III facilita la unión posterior de anticuerpos adicionales. Estas observaciones confirman claramente el uso de una composición con al menos 3 moléculas de anticuerpo contra EGFR distintas, en la que los anticuerpos se unen a distintos primer, segundo y tercer epítomos de EGFR. El efecto también se obtiene usando combinaciones específicas de dos anticuerpos de la invención seleccionando anticuerpos que proporcionen este efecto específico. Dichos anticuerpos son candidatos preferidos para mezclar con otros anticuerpos.

65 Las composiciones de la invención pueden proporcionar varias ventajas adicionales. Las células cancerosas expresan diversos EGFR. La variación se observa en la conformación, en la glucosilación y en la estructura primaria

(mutaciones y SNP). Un solo anticuerpo monoclonal puede dirigirse a algunas, aunque no a todas, de estas variaciones de EGFR. Los mutantes de EGFR pueden ser mutantes de escape para anticuerpos monoclonales. Un anticuerpo que comprende dos anticuerpos de la invención o tres o más anticuerpos distintos que se unen a distintos epítopos de EGFR es menos susceptible a mutantes, a SNP, a mutantes de delección y a variaciones en la glucosilación. Esto está confirmado por la amplia eficacia de las mezclas de anticuerpos descritas en el presente documento contra un panel de líneas de células de cáncer humano, que representan diversas conformaciones y variaciones de EGFR.

La administración de un anticuerpo monoclonal también puede no suspender la actividad quinasa de EGFR por completo. Mediante una combinación de anticuerpos puede obtenerse una inhibición de señalización más eficaz.

Por lo tanto puede ser beneficioso incluir anticuerpos que se unan a diferentes conformaciones de EGFR (por ejemplo, una conformación libre y formando dímeros con el receptor) en una mezcla de anticuerpos. Dicha mezcla de anticuerpos puede ser más fuente inhibiendo la actividad de EGFR en comparación con un anticuerpo monoclonal que se une solo a una de las conformaciones.

Adicionalmente, usando una estrategia con dos o más anticuerpos contra EGFR en la composición es posible aumentar la densidad de los anticuerpos en la superficie de las células tumorales aumentando de este modo la destrucción a través de la ADCC en comparación con los anticuerpos monoclonales.

En el presente documento también se describe un método para la fabricación de una composición de anticuerpos que comprende:

a) transfectar una primera población de células eucariotas con una primera construcción de expresión que codifica un primer anticuerpo que comprende un primer par homólogo de cadenas V_H y V_L capaz de unirse a un primer epítipo de EGFR distinto;

b) transfectar una segunda población de células eucariotas con una segunda construcción de expresión que codifica un segundo anticuerpo que comprende un segundo par homólogo de cadenas V_H y V_L capaz de unirse a un segundo epítipo de EGFR distinto;

c) opcionalmente repetir la etapa b) para una tercera población o poblaciones adicionales, construcciones de expresión, pares homólogos y epítopos de EGFR;

d) seleccionar una primera, una segunda y, opcionalmente, poblaciones celulares adicionales transfectadas;

e) combinar las poblaciones transfectadas en un recipiente para obtener un banco de células;

f) cultivar células del banco de células en condiciones que permitan la expresión de los anticuerpos; y

g) recuperar y purificar la composición de anticuerpos del sobrenadante.

Para facilitar la fabricación, el procesamiento aguas abajo y la caracterización, todos los anticuerpos comprenden la misma región constante de cadena pesada.

En el presente documento también se describe un banco de células que comprende al menos dos subpoblaciones de células eucariotas; comprendiendo cada subpoblación transfectada o transducida con una construcción de expresión que codifica un anticuerpo que comprende un par homólogo de cadenas V_H y V_L capaz de unirse a un epítipo de EGFR distinto. Preferentemente, las células se transfectan usando integración específica de sitio.

Adicionalmente, en el presente documento se describe un método de reducción de la señalización de EGFR que comprende administrar a una composición de células que expresan EGFR, una composición de anticuerpos de la invención y reducir la señalización de EGFR.

También se describe un método de destrucción de células que expresan EGFR que comprende administrar a una composición de células que expresan EGFR, una composición de anticuerpos de cualquiera de la invención y destruir las células que expresan EGFR.

Adicionalmente se describe un método de inducción de apoptosis en células que expresan EGFR, que comprende administrar a una composición de células que expresan EGFR, una composición de anticuerpos de la invención, induciendo de este modo la apoptosis.

También se describe un método de inhibición de la proliferación de células que expresan EGFR, que comprende administrar a una composición de células que expresan EGFR, una composición de anticuerpos de la invención inhibiendo de este modo la proliferación.

En el presente documento adicionalmente se proporciona una composición de anticuerpos de la invención para su uso en la inducción de la diferenciación de las células tumorales. Este aspecto se basa en los efectos observados sobre la diferenciación terminal *in vivo* de las células cancerosas cuando se exponen a una composición de anticuerpos de la invención.

La composición de anticuerpos de la invención puede usarse en combinación con al menos un compuesto capaz de inducir la diferenciación de las células cancerosas para la administración simultánea, individual o sucesiva en la carcinoterapia. Combinando las composiciones de anticuerpos de la invención con agentes que se sabe que inducen la diferenciación terminal de las células cancerosas, el efecto puede mejorarse aún más.

La composición de anticuerpos de la invención puede usarse en combinación con al menos un agente quimioterapéutico o antineoplásico para la administración simultánea, individual o sucesiva en la carcinoterapia. Es probable que la composición de anticuerpos de la invención pueda usarse para un tratamiento de segunda línea, es decir, después de, o simultáneamente con, un tratamiento usando agentes quimioterapéuticos o antineoplásicos convencionales, o después de, o simultáneamente con, radioterapia y/o cirugía.

En el presente documento también se describe un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en un ácido nucleico que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 23 (SEQ ID NO 100); un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 23 (SEQ ID NO 101); un ácido nucleico que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 34A (SEQ ID NO 102); y un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 34B (SEQ ID NO 103). Asimismo se describe un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 23 (SEQ ID NO 101) y un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 34B (SEQ ID NO 103), vectores de expresión que comprenden dicho ácido nucleico, como se ha definido anteriormente, unido operativamente a una secuencia promotora capaz de dirigir la expresión de dicho ácido nucleico, y una célula transfectada o transducida con dicho vector de expresión.

Estas secuencias constituyen las secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas del EGFR del mono Cinomolgo, es decir, de *Macaca fascicularis*. Esta especie de mono se usa mucho en estudios de toxicología en animales. Para que una especie animal tenga algún valor en un estudio de toxicología que implique anticuerpos contra autoantígenos humanos, es esencial que los anticuerpos también se unan a la proteína diana en el animal del dicho estudio de toxicología, preferentemente con aproximadamente la misma afinidad. Ahora, gracias a la contribución de los autores de la presente invención ha sido posible el ensayo de anticuerpos para determinar la unión al EGFR de Cinomolgo. El EGFR de Cinomolgo y de ser humano son proteínas altamente homólogas, pero sorprendentemente, se han descubierto diversos anticuerpos con afinidad muy diferente contra el EGFR de ser humano y de Cinomolgo. Esto pone de relieve la importancia, que ha sido demostrada por los autores de la invención, del uso preciso de la proteína de EGFR de Cinomolgo en la exploración.

En el presente documento también se describe un método para explorar la unión de anticuerpos al EGFR de Cinomolgo, que comprende las etapas de

- proporcionar al menos un anticuerpo de ensayo;
- realizar un ensayo para determinar la unión del anticuerpo con el dominio extracelular del EGFR de Cinomolgo (Figura 23, SEQ ID NO 101)) o con el EGFR de longitud completa de Cinomolgo (Figura 34B, SEQ ID NO 103)); o con la superficie de células que expresan el dominio extracelular del EGFR de Cinomolgo o que expresan el EGFR de longitud completa de Cinomolgo;
- y seleccionar al menos un anticuerpo que se una al dominio extracelular del EGFR de Cinomolgo.

El método puede comprender adicionalmente explorar la unión con el dominio extracelular del EGFR humano o la unión con células que expresen el EGFR humano.

También se describe un método de identificación de anticuerpos contra EGFR que puedan potenciar la unión simultánea de otro anticuerpo contra EGFR con EGFR, comprendiendo dicho método

- a. Un primer ensayo, que determina la capacidad de unión máxima de un primer anticuerpo con respecto a una cantidad fija del antígeno EGFR,
- b. En un segundo ensayo, saturar una cantidad fija del antígeno EGFR con un segundo anticuerpo contra EGFR,
- c. Poner en contacto el complejo EGFR-anticuerpo con dicho primer anticuerpo y determinar la capacidad de unión máxima, y
- d. Comparar las capacidades de unión para determinar si la capacidad de unión máxima de la etapa c. supera la capacidad de unión máxima de la etapa a.

Este ensayo puede usarse para identificar combinaciones adicionales de anticuerpos que tengan propiedades similares a las de los anticuerpos 992 y 1024.

Definiciones

- El término “anticuerpo” describe un componente de suero funcional y a menudo hace referencia a cualquiera de una colección de moléculas (anticuerpos o inmunoglobulinas) o a una molécula (la molécula de anticuerpo o la molécula de inmunoglobulina). Una molécula de anticuerpo tiene la capacidad de unirse a, o reaccionar con, un determinante antigénico específico (el antígeno o el epítipo antigénico), que a su vez, puede conducir a la inducción de mecanismos efectores inmunológicos. Una molécula de anticuerpo individual normalmente se considera como monoespecífica, y una composición de moléculas de anticuerpo pueden ser monoclonal (es decir, consistir en moléculas de anticuerpo idénticas) o policlonal (es decir, consistir en dos o más moléculas de anticuerpo diferentes que reaccionan con el mismo epítipo o con epítopos diferentes en el mismo antígeno o incluso en antígenos diferentes, distintos). Cada molécula de anticuerpo tiene una estructura exclusiva que permite que se una específicamente a su antígeno correspondiente, y todas las moléculas de anticuerpo naturales tienen la misma estructura básica general de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. Los anticuerpos también se conocen conjuntamente como inmunoglobulinas. Los términos anticuerpo o anticuerpos, de la manera en la que se usa en el presente documento, también pretenden incluir anticuerpos quiméricos y monocatenarios, así como fragmentos de unión de anticuerpos, tales como Fab, fragmentos Fv o fragmentos scFv, así como formas multiméricas tales como moléculas de IgA dimericas o IgM pentavalente . Un anticuerpo puede ser humano, murino, quimérico, humanizado o puede remodelarse.
- La expresión “par codificante V_H y V_L homólogo” describe un par original de secuencias codificantes V_H y V_L contenidas dentro, o procedentes de, la misma célula productora del anticuerpo. Por tanto, un par V_H y V_L homólogo representa el emparejamiento de V_H y V_L originalmente presente en el donante del cual procede dicha célula. La expresión “un anticuerpo expresado a partir de un par codificante V_H y V_L” indica que un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo se produce a partir de un vector, plásmido o similar, que contiene las secuencias codificantes V_H y V_L. Cuando se expresa un par codificante V_H y V_L homólogo, bien como un anticuerpo completo o como un fragmento estable del mismo, conserva la afinidad y especificidad de unión del anticuerpo originalmente expresado a partir de la célula de la que procede. Una biblioteca de pares homólogos también se denomina repertorio o colección de pares homólogos, y puede guardarse individualmente o agruparse.
- El término “CDR” - región determinante de la complementariedad - es como definen Lefranc *et al* (2003) en IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. Dev. Comp Immunol 27, 55-77.
- La expresión “un miembro distinto de una proteína policlonal recombinante” se refiere a una molécula de proteína de una composición de proteínas que comprende moléculas de proteína homólogas aunque diferentes, siendo cada molécula de proteína homóloga a las otras moléculas de la composición, aunque conteniendo también uno o más tramos de secuencia polipeptídica variable, que se caracteriza (caracterizan) por diferencias en la secuencia de aminoácidos entre los miembros individuales de la proteína policlonal.
- La expresión “promotores cabeza con cabeza” se refiere a un par de promotores que se coloca en estrecha proximidad de tal manera que la transcripción de dos fragmentos génicos conducida por los promotores se produce en direcciones opuestas. Un promotor cabeza con cabeza también puede construirse con un relleno compuesto de ácidos nucleicos irrelevantes entre los dos promotores. Dicho fragmento de relleno puede contener fácilmente más de 500 nucleótidos. Los promotores cabeza con cabeza también se denominan promotores bidireccionales.
- La expresión “inmunoglobulina” normalmente se usa como un nombre colectivo de la mezcla de anticuerpos que se encuentra en la sangre o en el suero, pero también puede usarse para nombrar una mezcla de anticuerpos que procede de otras fuentes.
- La expresión “molécula de inmunoglobulina” indica una molécula de anticuerpo individual, por ejemplo, que forma parte de una inmunoglobulina, o parte de cualquier composición de anticuerpos policlonal o monoclonal.
- La expresión “una biblioteca de moléculas de ácido nucleico variante de interés” se usa para describir el conjunto de moléculas de ácido nucleico, que colectivamente codifica una “proteína policlonal recombinante de interés”. Cuando se usa para la transfección, la biblioteca de moléculas de ácido nucleico variante de interés está contenida en una biblioteca de vectores de expresión. Dicha biblioteca típicamente tiene al menos 2, 3, 5, 10, 20, 50, 1000, 10⁴, 10⁵ o 10⁶ miembros distintos.
- La expresión “transferencia masiva” se usa para describir la transferencia de secuencias de ácido nucleico de interés de una población de vectores a otra población de vectores y hacer esto para cada ADN simultáneamente sin recurrir el aislamiento del ADN individual de interés. Dichas poblaciones de vectores pueden ser bibliotecas que contienen, por ejemplo, regiones variables, promotores, secuencias líder o elementos potenciadores de interés. Después, estas secuencias pueden llevarse sin aislamiento previo, por ejemplo, de un vector de fago a un vector de expresión de mamífero. Especialmente, para secuencias de anticuerpos, esta técnica garantiza que no se pierda la unión entre la diversidad de V_H y V_L aunque se lleven bibliotecas, por ejemplo, de un vector de selección (por ejemplo, un vector de

presentación en fagos) a un vector de expresión de mamíferos. Mediante esto el emparejamiento original de V_H y V_L se conserva.

Como se usa en el presente documento, la expresión “unido operativamente” se refiere a un segmento que se une a otro segmento cuando se coloca en una relación funcional con el otro segmento. Por ejemplo, un ADN que codifica una secuencia señal está unido operativamente a un ADN que codifica un polipéptido si este se expresa como un líder que participa en la transferencia del polipéptido en el retículo endoplasmático. Además, un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si estimula la transcripción de la secuencia.

La expresión “anticuerpo policlonal” describe una composición de moléculas de anticuerpo diferentes que tienen la capacidad de unirse a, o reaccionar con, diversos determinantes antigénicos específicos diferentes del mismo antígeno o de antígenos diferentes. Normalmente, se piensa que la variabilidad de un anticuerpo policlonal se localiza en las denominadas regiones variables del anticuerpo policlonal. Sin embargo, en el contexto de la presente invención, la policlonalidad también puede entenderse para describir diferencias entre las moléculas de anticuerpo individuales que residen en las denominadas regiones constantes, por ejemplo, como en el caso de mezclas de anticuerpos que contienen dos o más isotipos de anticuerpo, tales como los isotipos humanos IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2 o los isotipos murinos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgA. Para los fines de la presente invención, dicho anticuerpo policlonal también puede denominarse “una composición de anticuerpos”.

El término “epítipo” se usa comúnmente para describir una porción de una molécula más grande o de una parte de una molécula más grande (por ejemplo, antígeno o sitio antigénico) que tiene actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano. Un epítipo que tiene actividad inmunogénica es una parte de una molécula más grande que suscita una respuesta de anticuerpos en un animal. Un epítipo que tiene actividad antigénica es una parte de una molécula más grande a la que se une un anticuerpo inmunoespecíficamente, tal como se determina mediante cualquier método bien conocido en la técnica, por ejemplo, mediante los inmunoensayos descritos en el presente documento. Los epítipos antigénicos no tienen por qué ser necesariamente inmunogénicos. Un antígeno es una sustancia a la cual se une inmunoespecíficamente un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, una toxina, un virus, una bacteria, proteínas o ADN. Un antígeno o sitio antigénico a menudo tiene más de un epítipo, salvo que sea muy pequeño, y a menudo tiene la capacidad de estimular una respuesta inmunitaria. Los epítipos pueden ser lineales o conformacionales. Un epítipo lineal consta de aproximadamente 6 a 10 aminoácidos adyacentes en una molécula de proteína que reconoce un anticuerpo. Por otro lado, un epítipo conformacional consta de aminoácidos que no se disponen secuencialmente. En este caso el anticuerpo reconoce solo la estructura tridimensional. Cuando una molécula de proteína se pliega en una estructura tridimensional, los aminoácidos que forman el epítipo se yuxtaponen, permitiendo que el anticuerpo reconozca la secuencia. En una proteína desnaturalizada solo puede reconocerse el epítipo lineal. Un epítipo conformacional, por definición, debe estar fuera de la proteína plegada. Un anticuerpo que reconoce el epítipo conformacional solo puede unirse con procedimientos no desnaturizantes, suaves. Los anticuerpos que se unen a diferentes epítipos en el mismo antígeno pueden tener efectos que varían sobre la actividad del antígeno al que se unen dependiendo de la localización del epítipo. Un anticuerpo que se une a un epítipo en un sitio activo del antígeno puede bloquear completamente la función del antígeno, mientras que otro anticuerpo que se une a un epítipo diferente puede tener poco efecto, o ninguno, sobre la actividad del antígeno solo. Sin embargo, dichos anticuerpos pueden aún activar el complemento y por lo tanto producir la eliminación del antígeno, y pueden producir efectos sinérgicos cuando se combinan con uno o más anticuerpos que se unen a epítipos diferentes en el mismo antígeno. En la presente invención, el epítipo es preferentemente una porción del dominio extracelular de EGFR. Los antígenos de la presente invención son preferentemente proteínas, polipéptidos, o fragmentos de los mismos, de EGFR de dominio extracelular con el cual se une inmunoespecíficamente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Un antígeno asociado a EGFR también puede ser un análogo o un derivado del dominio extracelular del polipéptido de EGFR, o fragmento del mismo, al cual se une inmunoespecíficamente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

Los anticuerpos que tienen la capacidad de competir entre sí por la unión con el mismo antígeno pueden unirse al mismo epítipo o a epítipos solapantes o pueden tener un sitio de unión en estrecha proximidad entre sí, de manera que la competencia está principalmente ocasionada por un impedimento estérico. En los ejemplos se describen métodos para determinar la competición entre anticuerpos.

Como se usa en el presente documento, la expresión “proteína policlonal” o “policlonalidad”, se refiere a una composición de proteínas que comprende moléculas de proteína homólogas, pero diferentes, seleccionadas preferentemente de la superfamilia de inmunoglobulinas. Por tanto, cada molécula de proteína es homóloga a las otras moléculas de la composición, pero también contiene uno o más tramos de secuencias polipeptídicas variables, que se caracteriza (caracterizan) por diferencias en la secuencia de aminoácidos entre los miembros individuales de la proteína policlonal. Como ejemplos conocidos de dichas proteínas policlonales se incluyen moléculas de anticuerpo o de inmunoglobulina, receptores de células T y receptores de células B. Una proteína policlonal puede consistir en un subconjunto definido de moléculas de proteína, que se ha definido por una característica común, tal como la actividad de unión compartida hacia una diana deseada, por ejemplo, en el caso de un anticuerpo policlonal contra el antígeno diana deseado.

Por “proteína o “polipéptido” se entiende que es cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de la longitud o modificación postraduccional. Las proteínas pueden existir como monómeros o multímeros, que comprenden dos o más cadenas polipeptídicas, fragmentos de proteínas, polipéptidos, oligopéptidos o péptidos ensamblados.

5 El término “RFLP” (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) se refiere a “polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción”, un método mediante el cual el patrón migratorio del gel de los fragmentos de la molécula de ácido nucleico se analiza después de escisión con enzimas de restricción.

10 La expresión “translocación” describe situaciones en las que dos o más miembros distintos de una proteína policlonal que comprende dos cadenas polipeptídicas diferentes, por ejemplo, de la superfamilia de inmunoglobulina, se expresan a partir de una célula individual. Esta situación puede surgir cuando la célula individual ha integrado, en el genoma, más de un par de segmentos génicos, en el que cada par de segmentos génicos codifica un miembro distinto de la proteína policlonal. En dichas situaciones pueden hacerse combinaciones involuntarias de las cadenas polipeptídicas expresadas a partir de los segmentos génicos. Estas combinaciones involuntarias de las cadenas polipeptídicas podrían no tener ningún efecto terapéutico.

15 La expresión “translocación de cadenas V_H - V_L ” es un ejemplo de la translocación descrita anteriormente. En este ejemplo, los segmentos génicos que codifican V_H y V_L constituyen un par de segmentos génicos. La translocación ocurre cuando se producen combinaciones involuntarias de polipéptidos de V_H y V_L de una célula en la que dos pares de segmentos génicos que codifican V_H y V_L diferentes se integran en la misma célula. Es probable que dicha molécula de anticuerpo translocada no conserve la especificidad original y por tanto podría no tener ningún efecto terapéutico.

20 El término “transfección”, como se usa en el presente documento, es un término amplio para introducir ADN extraño en una célula. El término también significa que incluye otros métodos equivalentes funcionales para introducir ADN extraño en una célula, tal como, por ejemplo, transformación, infección, transducción o fusión de una célula donadora y una célula aceptora.

25 Las expresiones “secuencia polipeptídica variable” y “región variable” se usan indistintamente.

30 La expresión “epítomos distintos” significa que cuando dos anticuerpos diferentes se unen a epítomos distintos, hay una competencia menor del 100 % para la unión antigénica, preferentemente una competencia menor del 50 % para la unión antigénica, más preferentemente de un modo esencial no hay competencia para la unión antigénica. Un análisis para “epítomos distintos” de pares de anticuerpos se determina típicamente mediante experimentos de unión en condiciones de anticuerpos saturantes con cualquiera de análisis FACS en células que expresan EGFR y anticuerpos marcados individualmente con fluorescencia o Resonancia de Plasmón Superficial usando el antígeno EGFR capturado o conjugado con una superficie de célula de flujo como se describe en los ejemplos.

35 La expresión ser capaz de “inhibir la unión con EGF” cuando se aplica a una molécula de anticuerpo significa que la molécula de anticuerpo presenta un valor de CI50 con respecto a la unión de EGF con EGFR de menos de 10 nM, preferentemente menos de 8 nM, más preferentemente menos de 7 nM, más preferentemente menos de 5 nM, más preferentemente menos de 4 nM, más preferentemente menos de 3 nM, más preferentemente menos de 2 nM, más preferentemente menos de 1 nM.

40 Las expresiones “receptor del factor de crecimiento epidérmico” “EGFR” y “antígeno EGFR” se usan indistintamente en el presente documento, e incluyen variantes, isoformas y homólogos de especie del EGFR humano. En una realización preferida, la unión de un anticuerpo de la invención con el antígeno EGFR inhibe el crecimiento de células que expresan EGFR (por ejemplo, una célula tumoral) inhibiendo o bloqueando la unión del ligando de EGFR con EGFR. La expresión “ligando de EGFR” incluye todos los ligandos (por ejemplo fisiológicos) para EGFR, incluyendo pero sin limitación EGF, TGF-alfa, EGF de unión a heparina (HB-EGF), anfirregulina (AR), herregulina, betacelulina y epirregulina (EPI). En otra realización preferida, la unión de un anticuerpo de la invención con el antígeno EGFR media la fagocitosis de células efectoras y/o la destrucción de células que expresan EGFR.

45 Estructura de dominio de EGFR: la parte extracelular del EGFR maduro (SwissProt n.º de acceso P00533) consta de 621 aminoácidos y de cuatro dominios receptores: el dominio I incluye los restos 1-165, el dominio II los restos 166-312, el dominio III los restos 313-481 y el dominio IV los restos 482-621 (Cochran *et al.*, 2004, J. Immunol. Methods 287, 147-158). Se ha sugerido que los dominios I y III contribuyen a la formación de sitios de unión de alta afinidad para ligandos. Los dominios II y IV son regiones similares a laminina ricas en cisteína que estabilizan el plegamiento de las proteínas y contienen una posible interfaz de dimerización con EGFR.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión “inhibe el crecimiento” (por ejemplo, referente a células) pretende incluir cualquier disminución medible en la proliferación (aumento en el número de células) o metabolismo de una célula cuando se pone en contacto con un anticuerpo contra EGFR en comparación con el crecimiento de las mismas células que no se ponen en contacto con un anticuerpo contra EGFR, por ejemplo, la inhibición del

crecimiento de un cultivo de células por al menos aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 99 % o 100 %.

5 Como se usa en el presente documento, las expresiones “inhibe la unión” y “bloquea la unión” (por ejemplo, en referencia a la inhibición/bloqueo de la unión de un ligando de EGFR con EGFR) se usan indistintamente e incluyen inhibición/bloqueo tanto parcial como completo. La inhibición/bloqueo de la unión del ligando de EGFR con EGFR reduce o altera preferentemente el nivel o tipo normal de señalización celular que se produce cuando el ligando de EGFR se une a EGFR sin inhibición o bloqueo. La inhibición y el bloqueo también pretenden incluir cualquier
10 disminución medible en la afinidad de unión del ligando de EGFR con EGFR cuando se pone en contacto con un anticuerpo contra EGFR en comparación con el ligando cuando no se pone en contacto con un anticuerpo contra EGFR, por ejemplo, el bloqueo de ligandos de EGFR con EGFR por al menos aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 99 % o 100 %.

15 La expresión “anticuerpo recombinante” se usa para describir una molécula de anticuerpo o diversas moléculas de anticuerpo que se expresa (expresan) a partir de una célula o línea celular transfectada con un vector de expresión que comprende la secuencia codificante del anticuerpo que no está asociada de manera natural con la célula.

Descripción de los dibujos

20 Figura 1: Clasificación de esplenocitos (para detalles véase el Ejemplo 1). Se realizaron las siguientes selecciones (representadas):

- Selección 1: células vivas (representación gráfica de FSC/yoduro de propidio). (Panel izquierdo inferior)
- Selección 2: las células plasmáticas se seleccionan como CD43 pos/CD138 pos (Panel derecho inferior)
- Selección 3: discriminación doblete (panel derecho superior)

25 Figura 2: PCR mSymplex™ murina. RT-PCR de extensión solapante Multiplex para la amplificación y unión afín de genes de anticuerpo de cadena pesada y ligera de una sola célula. Para detalles remítase al Ejemplo 1.

30 Figura 3: Clonación del repertorio murino. Un conjunto de productos de la PCR mSymplex™ que codificaba los pares de genes VH/VL de células plasmáticas sencillas se cortaron y empalmaron con el gen que codificaba la cadena ligera constante kappa humana mediante corte y empalme por extensión solapante. El conjunto de genes, que codificaban anticuerpos quiméricos completos de ser humano-ratón, se insertó en un vector de expresión seguido de una inserción de un casete promotor bidireccional (2xCMV)

35 Figura 4A: Representación esquemática del vector de expresión de anticuerpos de longitud completa de mamífero 00-VP-002. Amp y Amp pro, gen de resistencia a ampicilina y su promotor; origen pUC, origen de replicación pUC; CMV, promotor de mamífero que dirige la expresión de la cadena ligera y la cadena pesada; líder IGHV, líder de cadena pesada humana genómica; relleno H, inserto que se intercambia por la secuencia que codifica la región variable de cadena pesada; IGHG1, secuencia que codifica la región constante de la cadena pesada del isotipo G1
40 de inmunoglobulina genómica (la secuencia se muestra en el Anexo 2); β globina A de conejo, secuencia poli A de la betaglobina de conejo; Líder IGKV, líder kappa murino; relleno L, inserto que se intercambia por secuencia que codifica la cadena ligera, term SV40, secuencia terminadora del virus de simio 40; FRT, sitio de reconocimiento diana de Flp; Neo, gen de resistencia a neomicina; SV40 poli A, secuencia señal poli A del virus de simio 40.

45 Figura 5: Análisis de grupo de la diferencia de absorbancia a 450-620 nm. Los sobrenadantes se agruparon según reactividad tal como se indica con el número indicado (del 1 al 4) después del número de clon. El color gris oscuro indica una disminución en el número de células metabólicamente activas, mientras que el gris claro indica un aumento en el número de células metabólicamente activas. El color negro indica sobrenadantes sin efecto sobre el número de células metabólicamente activas.

50 Figura 6: Grado de inhibición de anticuerpos contra EGFR con anticuerpos de referencia enumerados dirigidos contra dominios específicos de EGFR, determinado en un ensayo ELISA de competición. A) Cálculo de inhibición. B) La puntuación de inhibición es la siguiente: 25-49 %: competición moderada (+); 50-74 %: competición fuerte (++); 75-100 %: competición muy fuerte (+++). Los cuadros que presenta inhibición significativa (50-100 %) se somborean en gris. Erbitux y Vectibix se muestran por duplicado (cuatro experimentos independientes) para ilustrar la reproducibilidad del ensayo. Ab2 (225) es el precursor murino que conduce a Erbitux.

60 Figura 7: Ilustración de un ciclo de mapeo epitópico realizado en el aparato Biacore 3000 SPR, en el que un mA b de muestra compite por la unión con el dominio extracelular de EGFR con cuatro anticuerpos de referencia diferentes.

65 Figura 8: Grado de inhibición de anticuerpos contra EGFR con anticuerpos de referencia enumerados dirigidos contra dominios específicos de EGFR, determinado por análisis de competición con tecnología de resonancia por plasmón superficial, SPR. A) Cálculo de inhibición. B) La puntuación de la inhibición fue la siguiente: 25- 49 %: competición moderada (+); 50 - 74 %: competición fuerte (++); 75-100 %: competición muy fuerte (+++). Las células que representan inhibición significativa (50-100 %) se somborean en gris. El clon 1229 marcado con asterisco (*) no se unió en el ensayo Biacore.

Figura 9: Determinación de grupos de epítomos dentro del repertorio de anticuerpos contra EGFR mediante análisis de competición con SPR de pares de anticuerpos contra EGFR. Los anticuerpos se agruparon de acuerdo con un supuesto reconocimiento de dominio de EGFR. Las células en las que se descubrieron combinaciones de anticuerpos que se unían a epítomos solapantes que dieron como resultado una inhibición de más del 50 % se somborean en color gris. Las células en las que no se realizaron determinaciones se colorearon en negro. A) Cálculo de inhibición. B) La puntuación de la inhibición fue la siguiente: 25- 49 %: competición moderada (+); 50- 74 %: competición fuerte (++); 75-100 %: competición muy fuerte (+++).

Figura 10: Mapas epitópicos de anticuerpos de referencia y anticuerpos contra EGFR dirigidos contra el dominio extracelular de EGFR determinado por análisis Biacore. A) Mapeo epitópico de anticuerpos dirigidos contra el dominio I o dominio I/II del dominio extracelular (ECD, *Extra Cellular Domain*) de EGFR. B) Mapeo epitópico de anticuerpos dirigidos contra el dominio III del ECD de EGFR.

Figura 11: Investigación de la unión simultánea de una mezcla oligoclonal de anticuerpos dirigidos contra epítomos no solapantes en EGFR. A) adición secuencial de anticuerpos contra el dominio III, dominio I o especificidad desconocida. Los valores de inhibición de los mAb de muestras sencillas ensayados frente a diferentes mezclas de mAb o mAb sencillos se muestran en cuadros sombreados. También se muestran los valores de U_r máx usados para calcular la inhibición. B) Análisis de competición de seis mAb de muestras distintas dirigidos contra epítomos no solapantes en EGFR y una mezcla de anticuerpos que contienen los seis anticuerpos ensayados. Las mezclas de anticuerpos donde no se incluyó el anticuerpo de muestra ensayado sirvieron como un control positivo. Los valores de inhibición de mAb de muestras sencillas ensayados contra diferentes mezclas de mAb se muestran en cuadros sombreados. También se muestran los valores de U_r máx usados para calcular la inhibición. C) Los sensogramas correspondientes de los análisis en B ilustran el bloqueo de anticuerpos y, en algunos casos, la potenciación de la unión de los anticuerpos. D) Ensayo de anticuerpos adicionales dirigidos contra el dominio I, I/II y especificidad desconocida contra la mezcla de seis anticuerpos mAb.

Figura 12: Determinación del bloqueo del ligando EGF mediado por anticuerpos mediante titulación de anticuerpos en EGFR de longitud completa y detección de la unión del ligando EGF biotinilado con un reactivo de estreptavidina-HRP. Las IgG Erbitux, Vectibix y Synagis (palivizumab) se usaron como controles positivos y negativos, respectivamente. Después del bloqueo del epítipo del anticuerpo reconocido con los anticuerpos ensayados, se visualizó el grado de competición del ligando EGF por adición de 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de ligando EGF biotinilado y de un conjugado de estreptavidina-HRP secundario para la detección.

Figura 13: Efecto del tratamiento previo con los anticuerpos indicados sobre la fosforilación de EGFR inducida por EGF (50 ng/ml) en células HN5. Los anticuerpos (10 $\mu\text{g/ml}$) indicados en el gráfico se incubaron con las células durante 30 minutos antes de la adición de EGF durante 7,5 min. Los conjuntos de datos marcados con asterisco (*) fueron significativamente diferentes del conjunto de datos del control ((-) ctrl) ($p < 0,05$). A. 1208 tuvo un efecto protector significativo sobre la fosforilación de EGFR. B. 1277 y 1320 protegieron significativamente contra la fosforilación inducida por EGF. Las barras de error representan desviaciones típicas de tres experimentos independientes.

Figura 14: Análisis Western celular de EGFR fosforilado (pEGFR) y de EGFR en células HN5. La mezcla indica la mezcla equimolar de los anticuerpos 992, 1030 y 1042 a una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$, cada uno de los anticuerpos restantes se usó en una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$. Se añadieron 50 $\mu\text{g/ml}$ de EGF durante 7,5 minutos antes de la fijación para estimular la fosforilación de EGFR. Las barras de error representan desviaciones típicas de 6 (ctrl-) o de 3 (992, 1030, 1042, mezcla o Erbitux) puntos de datos distintos. El 992, 1030, la mezcla y Erbitux tuvieron un efecto protector significativo (* = $p < 0,05$) sobre la fosforilación.

Figura 15: Efecto de la incubación de anticuerpos sobre la internalización de EGFR. Los datos se muestran como porcentaje de receptores retirados de la superficie celular con respecto a la tinción inicial. Las barras de error corresponden al ETM.

Figura 16: Curvas de crecimiento de células A431-NS en presencia de diversas concentraciones de los anticuerpos 992, 1030 y 1042 y mezclas de los mismos medidas mediante el porcentaje de células metabólicamente activas en comparación con el control no tratado. 1001 es un anticuerpo no funcional con isotipo similar usado como control negativo.

Figura 17: Curvas de crecimiento de células A431-NS en presencia de 10 $\mu\text{g/ml}$ de los anticuerpos 992, 1030 y 1042 y mezclas de los mismos y diversas concentraciones de ligando EGF de EGFR medidas mediante la absorbancia a 450 nm. 1001 es un anticuerpo no funcional con isotipo similar usado como control negativo.

Figura 18: Curvas de crecimiento de células A431-NS en presencia de diversas concentraciones del anticuerpo 992 y mezclas de 992 y anticuerpos con epítomos no solapantes presentes en el dominio I, II o III. 1001 es un anticuerpo no funcional con isotipo similar usado como control negativo.

- Figura 19. Apoptosis en células A431 NS. Se ensayó la mezcla de EGFR, anticuerpos monoclonales individuales, Erbitux y Vectibix en diluciones de factor 10. El complejo histona-ADN de células apoptóticas se midió usando un kit ELISA de Roche.
- 5 Figura 20. Cuatro grupos de 10 ratones Balb/C Nu/Nu atímicos recibieron inóculo de 1×10^6 células A431NS. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mm^3 , se inició el tratamiento. Los grupos recibieron inyección de anticuerpos 1 mg/ml cinco veces durante el experimento, como se indica con las flechas. Los diámetros tumorales se midieron con calibradores digitales. Los resultados se muestran como volumen tumoral medio (+/- ETM).
- 10 Figura 21. Cuando los ratones individuales se sacrificaron en el experimento mostrado en la Figura 20, los tumores se extirparon y se pesaron. Se muestran los valores medios +/- ETM. El asterisco indica el significado a un valor de $p < 0,05$.
- 15 Figura 22. Crecimiento de esferoides de A431-NS en presencia de $10 \mu\text{g/ml}$ de los anticuerpos 1001, Erbitux, Vectibix y una mezcla de los tres anticuerpos con epítomos no solapantes 992+1030+1042. 1001 es un anticuerpo no funcional con isotipo similar usado como control negativo.
- 20 Figura 23: Secuencia de ADN (SEQ ID NO 100) y de proteína (SEQ ID NO 101) del dominio extracelular de EGFR de Cinomolgo clonada de ADNc procedente de epidermis de piel de mono Cinomolgo.
- Figura 24: Alineamiento de la secuencia de proteína obtenida del ECD de EGFR de Cinomolgo (SEQ ID NO 101) con el ECD de EGFR humano (SEQ ID NO 108) obtenido del GENBANK número de registro X00588. También se muestra una secuencia consenso (SEQ ID NO 109).
- 25 Figura 25: Ejemplo de discriminación con ensayo ELISA entre anticuerpos de reacción en cruzado y específicos de especie que se unen a cualquiera de los ECD de EGFR de Humano o de Cinomolgo o a ambos.
- 30 Figura 26: Fotomicrografías de secciones tumorales representativas de cada uno de los cuatro grupos experimentales de ratones xenoinjertados. A un aumento de 200x, las flechas indican focos de diferenciación terminal de células A431 *in vivo*. Obsérvese los focos notablemente más grandes y más numerosos de diferenciación terminal en el tumor tratado con una mezcla de tres clones contra EGFR (992+1030+1042), en los dos paneles superiores.
- 35 Figura 27: A) Imágenes tomadas a un aumento de 40x de esferoides de NH5, 24 horas después de la adición de $10 \mu\text{g/ml}$ del anticuerpo control. (Rituximab, contra CD20) o de la mezcla de anticuerpos 992 y 1024 contra EGFR. B) Cuantificación del área cubierta por células usando el programa informático Image J (* $p < 0,01$).
- 40 Figura 28. Diagrama que muestra los niveles de involucrina en los cuatro grupos de tratamiento como porcentaje del grupo de control no tratado (* $\#p < 0,005$ en comparación con Erbitux, Vectibix y con el grupo de control Negativo respectivamente).
- 45 Figura 29. A) Imágenes tomadas a aumentos de 60 x de células HN5 y A431NS incubadas durante 2 horas con Erbitux o con 992+1024 marcados con Alexa-488 $10 \mu\text{g/ml}$. B) Imágenes tomadas a un aumento de 60 x con un objetivo estenopeico (*pin-hole*) pequeño de células A431NS incubadas durante 2 horas con $10 \mu\text{g/ml}$ de Erbitux o con 992+1024 marcados con Alexa-488.
- Figura 30. A) Imágenes tomadas a aumentos de 60 x de células HN5 incubadas con $10 \mu\text{g/ml}$ de Erbitux o 992+1024 marcados con Alexa-488 durante los períodos de tiempo indicados.
- 50 Figura 31: Determinación de la especificidad de la presentación antigénica de los Fab 992, 1024 y 1030 mediante titulación de anticuerpos en serie en células A431-NS y EGFR purificado de longitud completa en ELISA. Los anticuerpos Fab unidos se visualizaron con un anticuerpo secundario de cabra contra Fab humano conjugado con HRP específico. A) Anticuerpos Fab ensayados contra EGFR de longitud completa purificado de células A431. B) Anticuerpos Fab ensayados contra EGFR expresado en la superficie de células A431-NS.
- 55 Figura 32: Determinación de la afinidad funcional de IgG y fragmentos Fab de anticuerpos 992, 1024, 1030, Erbitux y Vectibix mediante titulación en serie en células A431-NS fijadas en paraformaldehído en ELISA. Los anticuerpos Fab e IgG unidos se visualizaron con un anticuerpo secundario de cabra contra Fab humano conjugado con HRP específico. El anticuerpo contra la proteína de F del RSV Synagis se empleó como un anticuerpo de control negativo, y no mostró ninguna unión en el ensayo ELISA empleado. A) Unión funcional de anticuerpos IgG con células A431-NS. B) Unión funcional de anticuerpos Fab con células A431-NS.
- 60 Figura 33: Determinación de la potenciación de la unión de IgG con EGFR en células A431-NS después de saturación previa del receptor con fragmentos Fab que se unen a epítomos no solapantes. Se dejó que los fragmentos Fab indicados saturasen el epítopo de EGFR reconocido en células A431-NS durante 30 min, después de lo cual los anticuerpos IgG específicos se titularon en serie y se unieron a IgG con o sin adición de Fab
- 65

visualizado con anticuerpo secundario de ratón contra Fc de ser humano conjugado con HRP. A) Características de unión de IgG 992 con células A431-NS con o sin saturación previa del receptor con los fragmentos Fab indicados. B) Características de unión de IgG 1024 con células A431-NS con o sin saturación previa del receptor con los fragmentos Fab indicados. C) Características de unión de IgG 1030 con células A431-NS con o sin saturación previa del receptor con los fragmentos Fab indicados.

Figura 34: ADNc de EGFR de longitud completa de Cinomolgo (Figura 34A; SEQ ID NO 102) y proteína codificada (Figura 34B; SEQ ID NO 103).

Figura 35: Apoptosis obtenida en células A431NS con 1 µg/ml de los anticuerpos/combinaciones que se indican. Se detectaron complejos de histona-AD en un kit ELISA de Roche. Los niveles de apoptosis se relacionaron con los de un control positivo (apoptosis máxima).

Figura 36: Ratones nu/nu Balb/C recibieron inyección de 1×10^6 células A431 NS. Cuando los tumores alcanzaron un promedio de aproximadamente 100 mm³ los tratamientos se iniciaron. Los ratones recibieron 17 inyecciones con anticuerpo. El primer tratamiento comenzó el día 8 y el último el día 34. El anticuerpo/composiciones se inyectaron a 0,5 mg/dosis o a 0,17 mg/dosis. Se muestran valores medios del volumen tumoral +/- ETM.

Figura 37: Inhibición de la proliferación de células A431 NS. El eje X muestra diferentes combinaciones representativas de 3 anticuerpos de la invención. El eje Y muestra la actividad metabólica como porcentaje de control no tratado (control). Se representan barras de error +/- ETM. Para detalles adicionales véase el Ejemplo 6.

Figura 38. Efecto inhibitor del crecimiento de dos dosis diferentes de la mezcla de 992+1024 en comparación con Erbitux en xenoinjertos tumorales humanos A431 NS. Ratones nu/nu BALB/c se inocularon con 10^6 células A431 NS. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 100 mm³ (día 8) los ratones se asignaron al azar en grupos de 9 y comenzó el tratamiento. Los anticuerpos indicados se inyectaron a 0,5 mg/dosis o a 1 mg/dosis, dos veces a la semana durante un total de 9 inyecciones. En el gráfico, el área en color gris claro indica el periodo de tratamiento. El inicio de una línea de puntos señala el momento en el cual el primer ratón de un grupo determinado se sometió a eutanasia debido a un tamaño tumoral excesivo. Las diferencias estadísticamente significativas entre 2 mg/semana de 992+1024 frente a 2 mg/semana de Erbitux y 1 mg/semana de 992+1024 frente a 2 mg/semana de Erbitux se calcularon todas el día 60 excepto el grupo de 992+1024 2 mg/semana. El tamaño tumoral de los animales excluidos antes del día 60 se realizó, por tanto, el gráfico muestra el volumen tumoral acumulado de todos los ratones en un grupo determinado. Se muestran los valores medios +/- ETM.

Figura 39. Representación gráfica Kaplan-Meyer de la supervivencia de los ratones tratados con la mezcla de anticuerpos 992+1024, Erbitux o anticuerpo de control (mismo experimento que el mostrado en la Figura 38). Los resultados se presentan como porcentaje de supervivencia de los ratones tratados. Se observó una diferencia significativa entre el porcentaje de supervivencia de los ratones en los grupos tratados con una dosis alta (2 mg/semana, P = 0,0008) y una dosis baja (1 mg/semana, P = 0,0004) cuando se comparaba con 992+1024 y Erbitux. Además, una dosis baja de 992+1024 fue significativamente mejor cuando se comparó con una dosis alta de Erbitux (P = 0,0087). La diferencia estadística se calculó usando un ensayo de rango logarítmico (Mantel-Cox).

Figura 40: Análisis de reactividad cruzada de las IgG 992, 1024 y 1320 contra células CHO transfectadas con EGFR de longitud completa de Cinomolgo y de Humano mediante análisis FACS. El anticuerpo unido se detectó con un anticuerpo de cabra contra Fc F(ab')₂ de IgG de ser humano marcado con PE. La selección se realizó en células uniformes (propiedades SCC/FCS) que expresaban EGFR. La unión se expresó como % máximo de unión del anticuerpo a una concentración de 1 nM.

Figura 41: Alineamiento Clustalw2 de las secuencias de aminoácidos de las regiones variables candidatas humanizadas (hu) y murinas (qui (quiméricas)) de las cadenas tanto pesada como ligera de 992 (A) y 1024 (B). Las regiones CDR, definidas por IMGT, se indican subrayadas; los huecos se presentan con (-), los aminoácidos idénticos con (*), las mutaciones conservativas con (:), y las semiconservativas con (.). El aminoácido en negrita indica posiciones de aminoácidos donde se realizarán retromutaciones en el resto murino identificado original si las variantes estructurales completamente humanas presentan afinidad de unión disminuida. Los números de secuencia ID son los siguientes: VH 992 humanizado (SEQ ID NO 104). VL 992 humanizado (SEQ ID NO 105). VH 1024 humanizado (SEQ ID NO 106). VL 1024 humanizado (SEQ ID NO 107). VH 992 quimérico (aa 3-124 de SEQ ID NO 40). VL 992 quimérico (aa 3-109 de SEQ ID No 72). VH 1024 quimérico (aa 3-120 de SEQ ID NO 41). VL 1024 quimérico (aa 3-114 de SEQ ID NO 73).

Figura 42A: Representación esquemática de los genes que codifican el dominio variable doble para 992L1024; IGHV 992L1024 (751 pb) se representa desde el sitio de restricción 5' *AscI* seguido por IGHV 992, el enlazador ASTKGP, IGHV 1024 y terminación en el sitio de restricción 3' *XhoI*, IGKV 992L1024 (1071 pb) se representa desde el sitio de restricción 5' *NheI* seguido por IGKV 992, el enlazador TVAAP, IGKV 1024, IGKC y la terminación en el sitio de restricción 3' *NotI*.

Figura 42B: Representación esquemática de los genes que codifican el dominio variable doble de 1024L992; IGHV 1024L992 (751 pb) se representa desde el sitio de restricción *AscI* 5' seguido por IGHV 1024, el enlazador ASTKGP, IGHV 992 y terminación en el sitio de restricción 3' *XhoI*, IGKV 1024L992 (1071 pb) se representa desde el sitio de restricción 5' *NheI* seguido por IGKV 1024, el enlazador TVAAP, IGKV 992, IGKC y terminación en el sitio de restricción 3' *NotI*.

Descripción detallada de la invención

Mezclas de anticuerpos

En el presente documento se describe una composición de anticuerpos que comprende moléculas de anticuerpo capaces de unirse a al menos tres epítopos de EGFR distintos, preferentemente tres epítopos de EGFR no solapantes. La naturaleza no solapante de los anticuerpos se determina preferentemente usando anticuerpos marcados de manera diferente en un análisis FACS con células que expresan EGFR o usando resonancia de plasmón superficial usando el antígeno EGFR capturado o conjugado con una superficie de célula de flujo. También pueden usarse métodos basados en ELISA como se describe en los ejemplos. Una composición que se une a tres epítopos de EGFR no solapantes puede usarse contra una amplia serie de tipos de cáncer dependiente de EGFR dado que puede ser menos vulnerable a diferencias en la conformación de EGFR y menos vulnerable a mutaciones en comparación con una composición de anticuerpos monoclonales que se dirige a uno o más epítopos. Adicionalmente, la composición de anticuerpos que se une a tres epítopos de EGFR no solapantes puede proporcionar una eficacia superior en comparación con una composición que se dirige a menos epítopos. En particular, la composición de anticuerpos puede proporcionar eficacia superior con respecto a la diferenciación terminal de células cancerosas *in vivo*. Figura 37 numerosos ejemplos de fuertes composiciones de anticuerpos que se unen a tres epítopos de hEGFR distintos ilustran la aplicabilidad general del concepto.

Para una terapia con anticuerpos monoclonales contra EGFR una determinada proporción de pacientes no responderá eficazmente al tratamiento con anticuerpos. Para algunos de los pacientes, esto puede deberse a la rápida eliminación del anticuerpo o debido a que el anticuerpo genera una respuesta inmunitaria en el paciente contra el anticuerpo. Para algunos pacientes, la ausencia de respuesta puede ser porque su cáncer dependiente de EGFR particular expresa EGFR en una conformación en la que el anticuerpo monoclonal no puede unirse a su epítipo. Esto podría deberse a diferencias en la glucosilación, debido a una delección de dominio, o debido a mutaciones y/o SNP.

Además, para algunos cánceres, la estimulación autocrina del EGFR causada por la producción de ligandos de células cancerosas es importante, aunque en otros casos, el EGFR expresado por las células cancerosas no requiere estimulación de ligando. Para los últimos tipos de cáncer, un anticuerpo capaz de inhibir la unión con el ligando puede que no sea eficaz.

Una composición de anticuerpos en la que los anticuerpos pueden unirse al menos a tres epítopos distintos en EGFR será más ampliamente aplicable, dado que disminuye la probabilidad de que se cambien los tres epítopos en comparación con el epítipo (o epítopos) reconocido por los anticuerpos. Adicionalmente, la probabilidad de que el paciente elimine todos los anticuerpos es mucho más baja. Finalmente, los ejemplos muestran que en ensayos funcionales, una mezcla que comprende tres anticuerpos que se unen a epítopos distintos es superior a un anticuerpo monoclonal y a una mezcla que comprenda dos anticuerpos. La superioridad se ha mostrado más claramente en términos de inducción de diferenciación terminal de las células cancerosas usando tres anticuerpos de Dominio III con epítopos no solapantes. Dicha diferenciación terminal eficaz inducida por anticuerpos de las células cancerosas no se ha notificado anteriormente y representa una etapa significativa hacia adelante en el diseño eficaz de carcinoterapias basadas en anticuerpos. Resultados posteriores han mostrado que pueden obtenerse resultados similares o incluso superiores con una combinación particular de dos anticuerpos.

Para una eficacia clínica mejorada y una utilidad más general contra una amplia serie de tipos de cáncer dependientes de EGFR, el número de anticuerpos presente en la composición puede aumentarse. Por tanto, la composición puede comprender anticuerpos con capacidad para unirse a cuatro epítopos no solapantes. La composición puede comprender anticuerpos con capacidad para unirse a cinco epítopos no solapantes. La composición puede comprender anticuerpos con capacidad para unirse a seis epítopos no solapantes. Los ejemplos de la presente solicitud muestran que al menos seis anticuerpos distintos pueden unirse a la vez al EGFR (Ejemplo 3). Esto no excluye que sea posible, o incluso ventajoso, diseñar una composición que comprenda anticuerpos con capacidad para unirse a más de seis, tal como siete u ocho epítopos no solapantes, seleccionando cuidadosamente anticuerpos.

La composición puede comprender más de una molécula de anticuerpo que se una a un epítipo, tal como dos anticuerpos que se unen a epítopos diferentes aunque solapantes. Puede haber ventajas de incluir anticuerpos con epítopos solapantes ya que esto aumenta la probabilidad de que se una el epítipo. Una lógica detrás de esto es que el epítipo, en algunos pacientes y/o en algunas células cancerosas, puede cambiarse debido a cambios conformacionales o a mutaciones o a SNP (polimorfismos mononucleotídicos). Aunque esto pueda afectar a la unión de un anticuerpo, puede no afectar a la unión de otro anticuerpo que se una a un epítipo solapante. Asimismo,

existe un riesgo de que los pacientes eliminen uno de los anticuerpos, dado que este se contempla como un antígeno. Incluyendo dos anticuerpos que se unan a epítomos diferentes aunque solapantes, la consecuencia de la eliminación de uno de los dos anticuerpos y la consecuencia de una mutación en un epítomo disminuye.

5 La composición puede comprender dos anticuerpos que se unen a diferentes epítomos aunque solapantes. La composición puede comprender dos moléculas de anticuerpo distintas que se unan al mismo epítomo. Los anticuerpos que se unen a los mismos epítomos o a epítomos solapantes pueden ser del mismo isotipo o de isotipo diferente.

10 Una composición de anticuerpos que comprende anticuerpos dirigidos contra tres epítomos no solapantes puede comprender por tanto cuatro, cinco o seis moléculas de anticuerpo distintas de tal manera que dos anticuerpos se unan a dos epítomos solapantes, o al mismo primer epítomo, que otros dos anticuerpos se unan a otros dos epítomos solapantes, o al mismo segundo epítomo y que dos anticuerpos se unan a otros dos epítomos solapantes o al mismo tercer epítomo. Por supuesto, la composición puede comprender más de dos, tal como tres o cuatro moléculas de anticuerpo que pueden unirse a epítomos solapantes o que pueden unirse al mismo epítomo. Por tanto, el número de anticuerpos total incluido en la composición puede ser de más de 6, teniendo más de un anticuerpo para cada epítomo o teniendo varios anticuerpos con epítomos solapantes. Manteniendo constante la dosificación total de anticuerpo, para cada anticuerpo adicional incluido en la composición, la concentración de cada anticuerpo disminuye. Por lo tanto, se espera que haya un límite con respecto al número de anticuerpos que pueda incluirse en una composición, manteniendo al mismo tiempo una eficacia aceptable. Basándose en observaciones de los estudios de unión con Resonancia de Plasmón Superficial y ensayos de proliferación y teniendo en cuenta los desafíos durante la fabricación, se espera poder obtener una ventaja adicional limitada (si la hubiera) aumentando el número de anticuerpos de 6 a 7, 8, 9, 10 o más. Por supuesto, esto no excluye que la composición comprenda más de 10 anticuerpos, tal como 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 anticuerpos o más, tal como 25 anticuerpos o más, por ejemplo, 30 anticuerpos o más, tal como 40 anticuerpos o más, tal como 50 anticuerpos o más.

Aunque una composición de anticuerpos puede comprender anticuerpos que puedan unirse a al menos tres epítomos de EGFR no solapantes, también se han obtenido resultados superiores con combinaciones específicas de anticuerpos que pueden unirse a dos epítomos de EGFR no solapantes. Estas composiciones preferidas de "dos anticuerpos" se describen con más detalle más adelante junto con una guía que hace referencia a cómo diseñar composiciones de anticuerpos de la invención. Como resultado se ha obtenido que, comparando con la composición de tres anticuerpos que comprende los anticuerpos 992, 1030 y 1042, podría obtenerse una eficacia similar o incluso mejorada cuando se usa una composición solo con dos anticuerpos: 992 y 1024. Dado que los anticuerpos 1024 y 1042 pertenecen al mismo grupo, y por lo tanto tienen la misma especificidad de unión, en efecto, los resultados observados para la composición de tres anticuerpos, incluyendo el efecto sobre la diferenciación terminal, puede atribuirse a solo dos de las especificidades de unión (992 y 1024/1042) en la composición.

Adicionalmente al menos un anticuerpo en la composición se une a un epítomo de dominio III, más preferentemente la composición comprende al menos dos anticuerpos que se unen a epítomos de dominio III, y la composición también puede comprender tres anticuerpos que se unen a epítomos de dominio III.

La composición puede comprender al menos un anticuerpo con unión a un epítomo de dominio I y puede comprender al menos dos anticuerpos con unión a epítomos de dominio I.

45 La composición puede comprender al menos un anticuerpo con unión a un epítomo de dominio II y puede comprender anticuerpos con unión a dos epítomos de dominio II.

La composición también puede comprender un anticuerpo con unión a un epítomo de dominio I/II como se define en el presente documento.

50 La composición puede comprender un anticuerpo que puede unirse a un epítomo de dominio IV.

La composición puede comprender al menos una molécula de anticuerpo que puede inhibir la unión con EGF.

55 Adicionalmente, la composición puede comprender un anticuerpo capaz de prevenir la fosforilación de EGFR.

Adicionalmente la composición puede comprender un anticuerpo capaz de potenciar la internalización/degradación de EGFR.

60 La composición puede comprender al menos un anticuerpo de dominio III y al menos un anticuerpo de dominio I/II. Adicionalmente, la composición puede comprender al menos dos anticuerpos de dominio III y un anticuerpo de dominio I.

65 La composición puede comprender al menos dos anticuerpos de dominio III, tal como al menos tres anticuerpos de dominio III.

Los anticuerpos de la composición pueden ser anticuerpos quiméricos con cadenas variables no humanas y cadenas constantes humanas. Las cadenas variables no humanas pueden ser de ratón, rata, oveja, cerdo, pollo, primate no humano u de otro animal adecuado. Para obtener anticuerpos completamente humanos los anticuerpos pueden generarse en un animal transgénico con genes de anticuerpos humanos. Los anticuerpos también pueden denominarse anticuerpos humanizados, donde se han injertado las secuencias CDR no humanas en secuencias marco conservadas humanas.

Preferentemente, la cadena constante humana es de isotipo IgG1 o IgG2. Más preferentemente todos los anticuerpos en la composición tienen el mismo isotipo para facilitar la fabricación. Sin embargo, puede ser ventajoso incluir en la composición anticuerpos de isotipo diferente.

Preferentemente, las composiciones de anticuerpos de la invención comprenden anticuerpos capaces de unirse a EGFR seleccionado del grupo que consiste en EGFR humano, EGFR humano mutado, y variantes de delección de EGFR humano. Preferentemente, los anticuerpos pueden unirse a EGFR tanto de ser humano como de primate no humano, de manera que pueden ensayarse en estudios de toxicología relevantes antes de realizar experimentos clínicos. Preferentemente, el primate no humano es mono cinomolgo (*Macaca fascicularis*).

Para confirmar el concepto de tratamiento de cáncer dependiente de EGFR, identificado anteriormente, usando anticuerpos que se unen a tres o a más epítomos distintos, los autores de la presente invención han identificado, fabricado y caracterizado, una serie de anticuerpos quiméricos de ratón/ser humano dirigidos contra EGFR. Estos anticuerpos quiméricos se han comparado individualmente y en mezclas, con anticuerpos monoclonales del estado de la técnica, tales como, por ejemplo, Erbitux™ y Vectibix™.

La Tabla 1 muestra un resumen de los anticuerpos quiméricos individuales y de las características asociadas con estos. El N.º de anticuerpo es un número de referencia que se utiliza a lo largo de la presente solicitud. La especificidad es el dominio del EGFR al cual se une el anticuerpo, como se pone de manifiesto en el Ejemplo 3. deltaEGFR es la capacidad del anticuerpo para unirse a un mutante de EGFR (EGFRvIII) como se describe en el Ejemplo 1. EGFR de cinomolgo es la capacidad del anticuerpo para unirse al EGFR de cinomolgo (Ejemplo 10). Inhib. de EGF es la capacidad del anticuerpo para inhibir la unión con EGF (Ejemplo 4). La proliferación es la capacidad del anticuerpo para inhibir la proliferación de líneas de células cancerosas, A431 y HN-5 (Ejemplo 6).

Tabla 1. Anticuerpos de la invención y como se describe en el presente documento

N.º de anticuerpo	Especificidad	deltaEGFR	EGFR de cinomolgo	Inhib. de EGF	Proliferación
992	Dominio III	no/débil	sí	sí/débil	sí
1030	Dominio III	sí	sí	sí	sí
1024	Dominio III	sí	sí		sí
1042	Dominio III	débil	sí	(sí)	sí
1277	Dominio III	sí	Sí	sí	HN5
1254	Dominio III	sí	Sí	sí	HN5
					sí HN5+/-
1208	Dominio III	sí	sí	sí	992
1320	Dominio III	débil	No	sí	sí
1257	Dominio I/II	no	sí	no	sí
1261	Dominio I	no	Sí	no	sí
1229	Sin dominio I/II	sí	No	no	sí (A431)
1284	Dominio I	no	Sí	sí	sí
1344	Dominio I/II	no	sí	nd	HN5 w/992
1260	Dominio I/II	no	Sí	sí	A431
1308	Dominio I	no	sí	nd	HN5 w/992
1347	Dominio I	no	sí	nd	HN5 w/992
1428	Dominio I y II	no	Sí	sí	HN5 w/992

A partir de los datos generados con los anticuerpos quiméricos ensayados en solitario o en combinación en ensayos de proliferación, unión, degradación/inactivación de receptor y motilidad, y en modelos animales, pueden extraerse diversas conclusiones.

Los resultados obtenidos con dos líneas celulares de cáncer, HN-5 y A431 (Ejemplo 6) se han repetido con líneas celulares de diferentes cánceres (MDA-MB-468 una línea celular de cáncer de mama; DU145 una línea celular de cáncer de próstata). Lo que es evidente a partir de estos experimentos es que las combinaciones de los anticuerpos proporcionadas por los autores de la presente invención presentan eficacia contra una serie muy amplia de líneas de células cancerosas, confirmando la eficacia de las composiciones de anticuerpos contra una serie de conformaciones de EGFR.

También se ha mostrado que la superioridad de las mezclas de anticuerpos es mayor en ensayos de proliferación cuando se añaden al medio de crecimiento concentraciones fisiológicas de ligando (EGF) en comparación con cuando no se añade EGF (Figura 17). De acuerdo con la bibliografía (Hayashi y Sakamoto 1998 J Pharmacobiodyn 11; 146-51) el suero contiene aproximadamente de 1 a 1,8 ng/ml o de 0,2 a 0,3 nM de EGF aunque se indica que el jugo gástrico contiene 0,3 ng/ml (aprox. 0,05 nM) (Pessonen *et al.* 1987 Life Sci 40; 2489-94). En un entorno *in vivo*, el EGF y otros ligandos de EGFR están probablemente presentes y la capacidad de la mezcla de anticuerpos para que sea efectiva en presencia de ligando EGFR es por lo tanto una característica importante de las mezclas de anticuerpos de la presente invención.

Los anticuerpos de ratón/ser humano quiméricos proporcionan mejores resultados cuando se usan en combinación que cuando se usan en solitario. Esto se ilustra en diversos experimentos (véase, por ejemplo, el Ejemplo 6), en el que cuando los anticuerpos se ensayan en solitario solo muestran efectos antiproliferativos moderados en una línea celular de cáncer (A431-NS), pero cuando se usan en cualquier combinación, muestran resultados notablemente superiores. Estos resultados se han confirmado con numerosas combinaciones de los anticuerpos quiméricos de la presente invención. Se han obtenido resultados particularmente superiores con una composición que comprende los anticuerpos 992 y 1024.

Por ejemplo, en un ensayo de antiproliferación con A431-NS y HN-5, se han analizado diversos anticuerpos junto con cualquiera de los anticuerpos 992, 1208, 1254, y 1277.

Estudios de unión con receptores han mostrado que algunos anticuerpos pueden estimular realmente la unión de anticuerpos adicionales, de tal manera que un anticuerpo particular se une en mayores cantidades con el receptor después de la saturación del receptor con uno o varios anticuerpos. La unión del anticuerpo 992, dirigida contra el dominio III, se beneficia claramente de este efecto sinérgico obtenido por saturación previa del receptor con uno o más anticuerpos que se unen a epítomos no solapantes. Otro ejemplo de este efecto cooperativo se observa cuando el anticuerpo 1396, dirigido contra un epítomo desconocido, se ensaya contra EGFR saturado con anticuerpos que se unen a epítomos no solapantes.

Estudios de unión con receptores también han mostrado que es posible unir al menos 6 anticuerpos con el dominio extracelular de EGFR simultáneamente. Estos 6 anticuerpos representan 3 anticuerpos de dominio III, un anticuerpo de dominio I, un anticuerpo de dominio I/II y un anticuerpo que se une a un epítomo desconocido. Cabe destacar que, la unión de los tres anticuerpos de dominio III parece facilitar la unión posterior de anticuerpos adicionales. Esto confirma claramente el concepto de proporcionar composiciones de anticuerpos con diversos anticuerpos que se unan a epítomos distintos.

Cuando se diseña la composición de una composición de anticuerpos contra EGFR, los anticuerpos con epítomos no solapantes se usan preferentemente como estos proporcionando un efecto sinérgico superior.

También es preferible que al menos uno de los anticuerpos de la mezcla (cuando se ensaya en solitario) pueda inhibir la unión del ligando con EGFR, por ejemplo, pueda inhibir la unión con EGF y/o pueda inhibir la unión con TGFalfa y/o pueda inhibir la unión con la anfirregulina. El anticuerpo que puede inhibir la unión con EGF puede seleccionarse del grupo que consiste en los anticuerpos 992, 1030, 1024, 1042, 1208, 1254, 1277, 1284, 1320, y 1428, o del grupo que consiste en los anticuerpos 1208, 1260, 1277 y 1320.

Probablemente, es preferible que al menos un miembro de anticuerpo en la mezcla de anticuerpo pueda reducir la fosforilación de EGFR. Los ejemplos de anticuerpos con esta propiedad incluyen: 992, 1030, 1042, 1208, 1277 y 1320.

El dominio III de EGFR es de importancia para la unión del ligando con el receptor. Además, la unión del anticuerpo con el Dominio III puede estabilizar al EGFR en la conformación monomérica unida, que no conduce a la señalización del receptor. Por estas razones, la composición de anticuerpos debe contener al menos un anticuerpo con especificidad para el dominio III. Los anticuerpos de dominio III incluyen los anticuerpos 992, 1024, 1030, 1208, 1254, 1277 y 1320. Adicionalmente, el al menos un anticuerpo de dominio III puede seleccionarse del grupo que consiste en los anticuerpos 992, 1254, 1277, 1208 y 1320. La composición de anticuerpos puede comprender más de un anticuerpo de dominio III tal como al menos 3 anticuerpos de dominio III, por ejemplo al menos 4 anticuerpos de dominio III, tal como al menos 5 anticuerpos de dominio III, por ejemplo al menos 6 anticuerpos de dominio III.

Como se describe en el presente documento, la composición de anticuerpos puede comprender al menos un anticuerpo de dominio I. El al menos un anticuerpo de dominio I puede seleccionarse del grupo que consiste en los anticuerpos 1284, 1308, 1344 y 1347.

Como se describe en el presente documento, la composición de anticuerpos puede comprender al menos un anticuerpo de dominio I/II. El al menos un anticuerpo de dominio I/II puede seleccionarse del grupo que consiste en los anticuerpos 1257, 1260, 1261, 1428 y 1434.

Las combinaciones específicas eficaces de dos anticuerpos descritos en el presente documento son:

Anticuerpo 1280 junto con 1024, 1320, 1308, 1284, 1260 o 1030.

Anticuerpo 1254 junto con 1024, 1030, 1260, 1284, 1308 o 1320.

5 Anticuerpo 1277 junto con 1024, 1030, 1260, 1284, 1308 o 1320.

Anticuerpo 992 junto con 1030, 1260, 1284, 1308, 1320 o 1024.

10 Los ejemplos de mezclas superiores de dos anticuerpos incluyen 992+1024; 992+1320; 992+1042; 1277+1320; 1208+1320. Particularmente se prefiere 992+1024.

15 Las mezclas con tres anticuerpos incluyen: los anticuerpos 992+1030+1042; 992+1320+1024; 992+1024+1030; 1320+1284+1261; 1320+1214+1320; 992+1284+1320; 992+1255+1024; 992+1030+1320; 992+1024+1214; 992+1261+1320; 992+1024+1284; 992+1024+1211; 992+1024+1030; 1260+1214+1254; 992+1255+1320; 992+1211+1320; 992+1030+1261; 992+1260+1030; 992+1260+1320; 992+1030+1214.

20 Las mezclas con cuatro anticuerpos incluyen: los anticuerpos 992+1320+1024+1030; 992+1024+1030+1284; 1277+1320+1260+1347; 1277+1320+1261+1347; 1277+1320+1261+1284; 1254+1320+1260+1347; 1254+1320+1261+1347; 1254+1320+1261+1284; 1254+1024+1260+1347; 1254+1024+1261+1347; 1254+1024+1261+1284; 1277+1024+1260+1347; 1277+1024+1261+1347; 1277+1024+1261+1284.

25 Las mezclas con 5 anticuerpos incluyen: 992+1030+1024+1260+1347; 992+1030+1024+1261+1347; 992+1030+1024+1261+1284; 992+1030+1320+1260+1347; 992+1030+1320+1261+1347; 992+1030+1320+1261+1284;

Una mezcla con 8 anticuerpos incluye: 992+1030+1024+1277+1254+1320+1260+1261+1284+1347;

30 Adicionalmente, para poder realizar un estudio toxicológico en un primate no humano, es preferible que todos los anticuerpos de la composición se unan al EGFR de ser humano así como a al menos otro EGFR de primate, tal como EGFR de chimpancé, *Macaca mulatta*, mono Rhesus y otros monos, o mono cinomolgo. El mono cinomolgo es un animal relativamente pequeño, y muy bien adecuado para realizar estudios toxicológicos. Por lo tanto, el EGFR de primate adicional es preferentemente EGFR de mono cinomolgo. Preferentemente los anticuerpos se unen aproximadamente con la misma afinidad al EGFR de ser humano y al de primate no humano.

35 La presente divulgación ha mostrado resultados superiores en uno o más ensayos funcionales cuando se combinan 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8 anticuerpos en una composición. Aunque estos datos proporcionan una orientación sobre la selección del número de anticuerpos en la composición, de ninguna manera debe interpretarse de un modo limitante. La composición puede comprender más de 8 anticuerpos, aún cuando los datos experimentales solo muestren unión simultánea de 6 anticuerpos. Puede haber otras razones para incluir más de 6 anticuerpos en la composición, tal como, por ejemplo, diferencias en la tasa de eliminación de los miembros de anticuerpo.

40 Una característica adicional preferida de los anticuerpos de las composiciones es la homogeneidad de las proteínas, de tal manera que los anticuerpos pueden purificarse fácilmente. Para los miembros de anticuerpos individuales, se prefiere un perfil de cromatografía de intercambio iónico con un pico distinto para facilitar la caracterización. También se prefiere un perfil de cromatografía de intercambio iónico claro para facilitar la caracterización de la composición final de anticuerpos. También es preferible, cuando se combinan los anticuerpos, que puedan diferenciarse usando cromatografía de intercambio iónico, de tal manera que la composición con todos los anticuerpos pueda caracterizarse en un proceso.

50 Los anticuerpos pueden ser de cualquier origen, tal como ser humano, murino, conejo, pollo, cerdo, llama, cabra. Los anticuerpos también pueden ser quiméricos, como se describe en los ejemplos, o pueden ser humanizados, superhumanizados o versiones remodeladas de los mismos usando métodos bien conocidos descritos en la técnica.

55 *Una composición de anticuerpos preferida*

60 Como se muestra en los ejemplos que se adjuntan, la composición contra EGFR basada en los anticuerpos 992 y 1024 tiene propiedades únicas y distintas. La unión del anticuerpo 992 está potenciada por la unión de otros anticuerpos que incluyen 1024. A diferencia de lo que ocurre con los anticuerpos comerciales, tanto 992 como 1024 se unen preferencialmente a epítomos conformacionales presentados en las células (Ejemplos 14 y 15). Los dos epítomos de 992 y 1024 se solapan con pero son distintos del epítomo o epítomos de Erbitux y Vectibix. A diferencia de diversas otras composiciones de dos anticuerpos en las que los anticuerpos individuales se unen a epítomos no solapantes, la composición basada en las especificidades de unión de los anticuerpos 992 y 1024 desencadena la internalización del receptor rápida y eficazmente. Un nuevo mecanismo de acción que implica la diferenciación terminal acompañada de expresión aumentada de involucrina y la aparición de perlas de queratina se observa en un modelo animal después de tratamiento con las composiciones de anticuerpos basadas en los anticuerpos 992 y 1024. Este mecanismo de acción exclusivo conduce a una inhibición del crecimiento más eficaz y prolongada *in vitro*

e *in vivo*. Esto puede observarse más claramente en los ejemplos *in vivo* en los que los tumores continúan disminuyendo después de finalizar el tratamiento. En el grupo de control que recibe Erbitux, los tumores comienzan a crecer tan pronto como después de la terminación del tratamiento. Esto indica claramente un mecanismo de acción diferente.

5 Se piensa que el nuevo mecanismo de acción se realiza usando la combinación de dos especificidades de unión presentadas por los anticuerpos 992 y 1024 en la composición de anticuerpos. Este mecanismo de acción también se observa cuando se usa un tercer anticuerpo que no compite con los anticuerpos 992 y 1024, por ejemplo, en la combinación triple de anticuerpos 992, 1024 y 1030.

10 Estas observaciones han llevado a realizar el diseño de una composición de anticuerpos que comprende al menos 2 moléculas de anticuerpo contra EGFR humano distintas, en la que una primera molécula de anticuerpo contra EGFR distinta se selecciona del grupo que consiste en el anticuerpo 992, un anticuerpo que comprende las secuencias VL (aminoácidos 3-109 de SEQ ID NO 72) y VH (aminoácidos 3-124 de SEQ ID NO 40) del anticuerpo 992, y un anticuerpo que tiene las CDR del anticuerpo 992; y en el que una segunda molécula de anticuerpo contra EGFR distinta se selecciona del grupo que consiste en el anticuerpo 1024, un anticuerpo que comprende las secuencias VL (aminoácidos 3-114 de SEQ ID NO 73) y VH (aminoácidos 3-120 de SEQ ID NO 41) del anticuerpo 1024, y un anticuerpo que tiene las CDR del anticuerpo 1024.

20 La primera molécula de anticuerpo contra EGFR distinta se selecciona del grupo que consiste en el anticuerpo 992, un anticuerpo que comprende las secuencias VL y VH del anticuerpo 992, y un anticuerpo que tiene las CDR del anticuerpo 992; y dicha segunda molécula de anticuerpo contra EGFR distinta se selecciona del grupo que consiste en el anticuerpo 1024, un anticuerpo que comprende las secuencias VL y VH del anticuerpo 1024, y un anticuerpo que tiene las CDR del anticuerpo 1024.

25 En el presente documento también se describen mutaciones en las secuencias CDR3 de los anticuerpos 992 y 1024 para proporcionar anticuerpos con la misma especificidad de unión. Por lo tanto, como se describe en el presente documento, un anticuerpo que tiene la misma especificidad de unión que la del anticuerpo 992 comprende una CDRH3 que tiene la siguiente fórmula: CTX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅W en la que X₁ a X₁₅ se seleccionan individualmente de los grupos de aminoácidos indicados a continuación

35 X₁ = R o K;
 X₂ = N, D, E o Q;
 X₃ = G, A, V, o S;
 X₄ = D, E, N o Q;
 X₅ = Y, F, W o H;
 X₆ = Y, F, W o H;
 X₇ = V, I, L o A;
 X₈ = S, T, G o A;
 40 X₉ = S, T, G o A;
 X₁₀ = G, A, V, o S;
 X₁₁ = D, E, N o Q;
 X₁₂ = A, G, V, o S;
 X₁₃ = M, L, I o V
 45 X₁₄ = D o E; y
 X₁₅ = Y, o F;

y una CDRL3 descrita mediante la siguiente fórmula: CX₁X₂X₃X₄X₅X₆PPTF en la que X₁ a X₆ se seleccionan individualmente de los grupos de aminoácidos indicados a continuación:

50 X₁ = Q o H;
 X₂ = H, E o Q;
 X₃ = Y, F, W o H;
 X₄ = N, Q o H;
 X₅ = T, S, G o A; y
 X₆ = V, I, L o A.

55 Como se describe en el presente documento, un anticuerpo que tiene la misma especificidad de unión que la del anticuerpo 1024 comprende una CDRH3 que tiene la siguiente fórmula: CVX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁W en la que X₁ a X₁₁ se seleccionan individualmente de los grupos de aminoácidos indicados a continuación

60 X₁ = R o K;
 X₂ = Y, F, W o H;
 X₃ = Y, F, W o H;
 X₄ = G, A, V, o S;
 X₅ = Y, F, W o H;
 X₆ = D, E, N o Q;
 X₇ = E o D;
 65 X₈ = A, G, V, o S;
 X₉ = M, L, I o V;

$X_{10} = D, E, N \text{ o } Q; y$

$X_{11} = Y, \text{ o } F;$

y una CDR3 descrita mediante la siguiente fórmula: $CX_1X_2X_3X_4X_5X_6PX_7TF$ en la que X_1 a X_7 se seleccionan individualmente de los grupos de aminoácidos indicados a continuación:

$X_1 = A, G, \text{ o } V;$

$X_2 = Q \text{ o } H;$

$X_3 = N, Q \text{ o } H;$

$X_4 = L, I, M \text{ o } V;$

$X_5 = E, D, N \text{ o } Q;$

$X_6 = L, I, M \text{ o } V; y$

$X_7 = Y, F, W \text{ o } H.$

Los anticuerpos con las CDR3 mutadas pueden prepararse usando técnicas convencionales y expresarse y ensayarse con respecto a su unión usando métodos descritos en el presente documento.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden ser quiméricos, humanos, humanizados, remodelados o superhumanizados. Esto puede realizarse usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos 992 y 1024 pueden humanizarse usando los métodos descritos en el Ejemplo 18. En el documento US 6.881.557 se describen métodos para la "superhumanización".

La primera molécula de anticuerpo contra EGFR distinta se selecciona del grupo que consiste en el anticuerpo 992, un anticuerpo que comprende las secuencias VL y VH del anticuerpo 992, y un anticuerpo que tiene las CDR del anticuerpo 992; y dicha segunda molécula de anticuerpo contra EGFR distinta se selecciona del grupo que consiste en el anticuerpo 1024, un anticuerpo que comprende las secuencias VL y VH del anticuerpo 1024, y un anticuerpo que tiene las CDR del anticuerpo 1024.

Más preferentemente la composición comprende los anticuerpos 992 y 1024.

Como se describe, preferentemente, el primer y segundo anticuerpo contra EGFR, no inhiben entre sí la unión con el EGFR humano. Incluso más preferentemente, al menos uno de los anticuerpos tiene la capacidad de aumentar la capacidad de unión máxima del otro anticuerpo con respecto al EGFR humano. Este efecto se observa en los anticuerpos 992 y 1024 (Ejemplo 16).

La proporción entre los dos anticuerpos no tiene por qué ser exactamente una proporción de 1:1. Por consiguiente, la proporción del primer anticuerpo con respecto al segundo anticuerpo en la composición puede ser entre 5 y 95 %, tal como entre 10 y 90 %, preferentemente entre 20 y 80 %, más preferentemente entre 30 y 70, más preferentemente entre 40 y 60, tal como entre 45 y 55, tal como aproximadamente 50 %.

Preferentemente, el primer y segundo anticuerpo son del isotipo IgG1 o IgG2.

Los ejemplos de anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo 992 identificados por los autores de la presente invención son anticuerpos del grupo de anticuerpos que comprenden los clones 1209, 1204, 992, 996, 1033 y 1220.

Los ejemplos de anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo 1024 identificado por los autores de la presente invención son anticuerpos del grupo de anticuerpos que comprenden los clones 1031, 1036, 1042, 984, 1024, 1210, 1217, 1221 y 1218.

La CDR3 determina la especificidad de unión de los anticuerpos. Las secuencias CDR de los anticuerpos pueden encontrarse en la Tabla 12, ejemplo 17.

La competición de los anticuerpos con el anticuerpo 992 como se describe en el presente documento puede seleccionarse del grupo que consiste en los anticuerpos 1208, 1254, y 1277. Del mismo modo, la competición del anticuerpo con el anticuerpo 1024 puede seleccionarse del grupo que consiste en los anticuerpos 1042 y 1320.

En una realización, la composición no contiene anticuerpos adicionales además de dichos primer y segundo anticuerpo, más preferentemente no contiene más anticuerpos contra EGFR.

Cuando la composición comprende adicionalmente un tercer anticuerpo contra EGFR distinto, en el que dicha tercera molécula de anticuerpo contra EGFR distinto se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo 1030, un anticuerpo que comprende las secuencias VL (aminoácidos 3-113 de SEQ ID NO 74) y VH (aminoácidos 3-120 de SEQ ID NO 42) del anticuerpo 1030, un anticuerpo que tiene las CDR3 del anticuerpo 1030 (SEQ ID NO 112 y 119), un anticuerpo que se une al mismo epítipo que el anticuerpo 1030, y un anticuerpo capaz de inhibir la unión del anticuerpo 1030 con EGFR humano. Dicho tercer anticuerpo da, preferentemente, como resultado una unión potenciada al EGFR humano de dicho primer y/o segundo anticuerpo. En una realización, la composición no

contiene anticuerpos adicionales además de dichos primer, segundo y tercer anticuerpo, más preferentemente no contiene más anticuerpos contra EGFR.

5 La unión del anticuerpo al mismo epítipo que el anticuerpo 1030 como se describe en el presente documento, puede seleccionarse del grupo de anticuerpos que consiste en los clones 1195, 1030, 1034, 1194, 980, 981, 1246 y 1223.

10 El anticuerpo que comprende la CDR3 del anticuerpo 1030 puede comprender adicionalmente la CDR1 y CDR2 de VH y VL del anticuerpo 1030.

10 Los anticuerpos pueden formularse en un envase para su administración. Sin embargo, pueden fabricarse, purificarse y caracterizarse individualmente y proporcionarse en dos o tres envases distintos como un kit de partes, con un anticuerpo en cada envase. Como tal, pueden administrarse de manera simultánea, sucesiva o individual.

15 En un aspecto adicional las dos especificidades de unión de los anticuerpos 992 y 1024 se combinan en una molécula de unión biespecífica. La molécula de unión biespecífica comprende las CDR de los anticuerpos 992 y 1024, más preferentemente las secuencias VH y VL de los anticuerpos 992 y 1024. La molécula de unión biespecífica puede ser un anticuerpo con dos dominios variables, como se describe en el ejemplo 19. Una molécula de unión biespecífica también puede diseñarse en forma de un fragmento Fab biespecífico, un scFv biespecífico o un diacuerpo como se describe en la bibliografía.

20 Las composiciones de anticuerpos basadas en las especificidades de unión pf de los anticuerpos 992 y 1024 conducen preferentemente a una o más de internalización del receptor, regresión de tumores A431 NS *in vivo*, inducción de diferenciación terminal en células A431 NS *in vivo* y a regulación positiva de la expresión de involucrina tumoral *in vivo*.

25 En el presente documento se describen varios ejemplos de anticuerpos que tienen los mismos efectos o similares que la combinación de anticuerpos 992 y 1024. Los ejemplos de estos incluyen anticuerpos obtenidos de la misma inmunización y que pertenecen a los mismos grupos y anticuerpos que compiten individualmente con uno de los dos anticuerpos. Las composiciones de anticuerpos con el mismo efecto o similar pueden diseñarse basándose en secuencias VL y VH de los anticuerpos 992 y 1024 y también basándose en las CDR de estos anticuerpos, en particular las CDR 3s de los dos anticuerpos.

30 Pueden realizarse otras composiciones de anticuerpos con los mismos efectos o con efectos similares realizando inmunización y exploración esencialmente como se describe en los ejemplos. Los anticuerpos con la misma especificidad de unión que la del anticuerpo 992 y 1024 pueden identificarse en dos ensayos de competición distintos como se describe en el presente documento. Finalmente, realizando experimentos de unión esencialmente como se describe en el Ejemplo 16 pueden identificarse composiciones de anticuerpos en las que un anticuerpo potencia la unión del otro anticuerpo. Adicionalmente, las composiciones de anticuerpos pueden explorarse como se describe en los ejemplos para determinar los efectos sobre la internalización del receptor, eficacia *in vitro* e *in vivo*, afinidad de unión etc.

Usos de las composiciones de anticuerpos de la invención

45 Para su uso en el tratamiento *in vivo* y prevención de enfermedades relacionadas con la expresión de EGFR (por ejemplo, sobreexpresión), los anticuerpos de la invención se administran a pacientes (por ejemplo, sujetos humanos) a dosificaciones terapéuticamente eficaces (por ejemplo, dosificaciones que darán como resultado la inhibición del crecimiento, la fagocitosis, reducción de la motilidad, diferenciación terminal y/o destrucción de células tumorales que expresan EGFR) usando cualquier vía de administración adecuada, tal como inyección u otras vías de administración conocidas en la técnica para productos clínicos basados en anticuerpos.

50 Las enfermedades típicas relacionadas con EGFR que pueden tratarse, mejorarse y/o prevenirse usando los anticuerpos de la invención incluyen, pero sin limitación, enfermedades autoinmunitarias y cánceres. Por ejemplo, los cánceres que pueden tratarse, mejorarse y/o prevenirse incluyen cáncer de vejiga, de mama, uterino/de cuello uterino, de colon, de riñón, de ovario, de próstata, de células renales, de páncreas, de colon, de recto, de estómago, de células escamosas, pulmonar (no microcítico), de esófago, de cabeza y cuello, de piel. Las enfermedades autoinmunitarias que pueden tratarse incluyen, por ejemplo, soriasis.

55 En otra realización más, la invención se refiere a un método para el tratamiento, mejora y/o prevención de glioblastoma, incluyendo glioblastoma multiforme; astrocitoma, incluyendo astrocitoma juvenil; glioma; neuroblastoma; tumores neuroendocrinos del tracto gastrointestinal; carcinoma bronco alveolar; sarcoma folicular de células dendríticas; carcinoma de glándulas salivares; ameloblastoma; tumor maligno de la vaina nerviosa periférica, tumores pancreáticos endocrinos; o tumores de células germinales testiculares, incluyendo seminoma, carcinoma embrionario, tumor de saco vitelino, teratoma y coriocarcinoma.

65

Aislamiento y selección de pares que codifican la cadena ligera variable y cadena pesada variable

El proceso para la generación de una composición de anticuerpos recombinantes contra EGFR implica el aislamiento de secuencias que codifican las cadenas pesada variable (V_H) y ligera variable (V_L) de una fuente adecuada, generando de este modo un repertorio de pares codificantes V_H y V_L . Generalmente, una fuente adecuada para obtener secuencias codificantes V_H y V_L son fracciones de células que contienen linfocitos tales como muestras de sangre, bazo o médula ósea de un animal no humano inmunizado/vacunado con un polipéptido o péptido de EGFR humano o con proteínas de EGFR procedentes de una célula que expresa el EGFR humano o con células que expresan EGFR humano o fracciones de dichas células. Preferentemente, las fracciones que contienen linfocitos se extraen de mamíferos no humanos o de animales transgénicos con genes de inmunoglobulina humana. La fracción celular que contiene los linfocitos recogidos puede enriquecerse adicionalmente para obtener una población de linfocitos particular, por ejemplo, células de la estirpe de linfocitos B. Preferentemente, el enriquecimiento se realiza usando separación celular con perlas magnéticas (MACS) y/o separación celular activada con fluorescencia (FACS), aprovechando proteínas marcadoras de la superficie celular específicas de estirpe, por ejemplo, células B, blastos plasmáticos y/o células plasmáticas. Preferentemente, la fracción celular que contiene linfocitos se enriquece o separa con respecto a células B, blastos plasmáticos y/o células plasmáticas. Incluso más preferentemente, las células con alta expresión de CD43 y CD138 se aíslan del bazo o sangre. Estas células a veces se denominan células plasmáticas circulantes, células plasmáticas tempranas o blastos plasmáticos. Para simplificar, en el presente documento reciben solo el nombre de células plasmáticas, aunque pueden usarse indistintamente otros términos.

El aislamiento de secuencias codificantes V_H y V_L puede realizarse de una forma clásica, en la que las secuencias codificantes V_H y V_L se combinan al azar en un vector para generar una biblioteca combinatoria de pares de secuencias que codifican V_H y V_L . Sin embargo, en el presente documento, se prefiere reflejar la diversidad, la afinidad y la especificidad de los anticuerpos producidos en una respuesta inmunitaria humoral después de inmunización con EGFR. Esto implica el mantenimiento del emparejamiento de V_H y V_L originalmente presente en el donante, generando de este modo un repertorio de pares de secuencias en el que cada par codifica una cadena pesada variable (V_H) y una cadena ligera variable (V_L) correspondiente a un par V_H y V_L presente en un principio en un anticuerpo producido por el donante a partir del cual se aíslan las secuencias. Este también se denomina par homólogo de secuencias codificantes V_H y V_L y el anticuerpo se denomina anticuerpo homólogo. Preferentemente, los pares codificantes V_H y V_L , combinatorios u homólogos, se obtienen de ratones donantes, y por lo tanto las secuencias son murinas.

Hay varias estrategias diferentes para la generación de pares homólogos de secuencias codificantes V_H y V_L , una estrategia implica la amplificación y el aislamiento de secuencias codificantes V_H y V_L de células sencillas separadas de una fracción celular que contiene linfocitos. Para obtener un repertorio de pares de secuencias codificantes de V_H y V_L que se asemejen a la diversidad de pares de secuencias V_H y V_L en el donante, se prefiere un método de alto rendimiento con una pequeña transposición (combinación al azar) de los pares V_H y V_L según sea posible, por ejemplo, como se describe en el documento WO 2005/042774.

Las secuencias codificantes V_H y V_L pueden amplificarse individualmente y emparejarse en una segunda etapa o pueden emparejarse durante la amplificación (Coronella *et al.* 2000. Nucleic Acids Res. 28: E85; Babcook *et al.* 1996. PNAS 93: 7843-7848 y documento WO 2005/042774). Una segunda estrategia implica la amplificación en células y el emparejamiento de las secuencias codificantes V_H y V_L (Embleton *et al.* 1992 Nucleic Acids Res. 20: 3831-3837; Chapal *et al.* 1997. BioTechniques 23: 518-524). Una tercera estrategia es el método de anticuerpos con linfocitos seleccionados (SLAM; del inglés, *selected lymphocyte antibody method*) que combina un ensayo de placa hemolítica con clonación de ADNc de V_H y V_L (Babcook *et al.* 1996. PNAS 93: 7843-7848). Otro método que puede usarse con ratones es la técnica convencional de hibridoma, seguido por exploración y selección de candidatos líder y posterior clonación de los anticuerpos codificados.

En una realización preferida de la presente invención se genera un repertorio de pares codificantes V_H y V_L , en el que los pares de miembros reflejan los pares de genes responsables de la respuesta inmunitaria humoral resultante de una inmunización con EGFR, de acuerdo con un método que comprende las etapas de i) proporcionar una fracción celular que contenga linfocitos de un animal donante inmunizado con EGFR humano; ii) opcionalmente enriquecer células B o células plasmáticas de dicha fracción de células; iii) obtener una población de células sencillas aisladas, que comprende distribuir células de dicha fracción celular individualmente en una pluralidad de recipientes; iv) amplificar y efectuar la unión de los pares codificantes V_H y V_L , en un procedimiento de PCR en tiempo real de extensión solapante múltiple, usando un molde procedente de dichas células sencillas aisladas y v) opcionalmente realizar una PCR anidada de los pares codificantes V_H y V_L unidos. Preferentemente, los pares codificantes V_H y V_L homólogos aislados se someten a un procedimiento de exploración como se describe más adelante.

Una vez generados los pares de secuencias V_H y V_L , se realiza un procedimiento de exploración para identificar secuencias que codifican los pares V_H y V_L con reactividad de unión hacia un antígeno asociado con EGFR. Preferentemente, el antígeno asociado con EGFR comprende una parte extracelular de EGFR tal como el dominio III, II, I y/o IV, fragmentos de los dominios o el dominio extracelular completo. Otros antígenos incluyen mutantes

tales como mutantes de delección de EGFR o SNP, o fragmentos de los mismos. Si los pares de secuencias V_H y V_L son combinatorios, puede aplicarse un procedimiento de presentación en fagos para enriquecer los pares V_H y V_L que codifican los fragmentos de anticuerpo de unión a EGFR antes de la exploración.

5 Para reflejar la diversidad, la afinidad y la especificidad de los anticuerpos producidos en una respuesta inmunitaria humoral después de inmunización con EGFR, en el presente documento se describe un procedimiento de exploración para los pares homólogos, para obtener la diversidad más amplia posible. Con el fin de explorar, el repertorio de pares codificantes V_H y V_L homólogos se expresa individualmente como fragmentos de anticuerpo (por ejemplo scFv o Fab) o como anticuerpos de longitud completa usando un vector de exploración bacteriano o de mamíferos transfectado en una célula hospedadora adecuada. El repertorio de Fab/anticuerpos puede explorarse -
10 sin limitación – para determinar la reactividad contra EGFR, para determinar la actividad antiproliferativa contra una línea de células de cáncer que exprese EGFR y para determinar la capacidad de inhibir la unión del ligando (por ejemplo EGF) con EGFR, para determinar la inhibición de la fosforilación, la inducción de la apoptosis, la internalización de EGFR.

15 En paralelo, el repertorio de los Fab/anticuerpos se explora contra antígenos seleccionados, tales como péptidos de EGFR de ser humano y opcionalmente de mono cinomolgo o chimpancé o mono rhesus. Los péptidos antigénicos pueden seleccionarse, por ejemplo, del dominio extracelular de EGFR humano, del dominio extracelular de EGFR mutante humano y del dominio extracelular de EGFR de cinomolgo o fragmentos de los mismos. Los péptidos pueden biotinilarse para facilitar la inmovilización en perlas o placas durante la exploración. También pueden utilizarse medios de inmovilización alternativos. Los antígenos se seleccionan basándose en el conocimiento de la biología de EGFR y posiblemente pueden proporcionarse anticuerpos con efectos protectores y/o neutralizantes esperados capaces de unirse a estos antígenos. Este procedimiento de exploración puede aplicarse del mismo modo a una biblioteca combinatoria de presentación en fagos.

20 Las proteínas de EGFR recombinante usadas para explorar pueden expresarse en bacterias, en células de insecto, en células de mamífero o en otro sistema de expresión adecuado. Para el correcto procesamiento (incluyendo la glucosilación) las proteínas se expresan en células de mamífero. La proteína EGFR-ECD puede expresarse como una proteína soluble (sin la región transmembrana e intracelular) o puede fusionarse a una tercera proteína, para aumentar la estabilidad. Si la proteína EGFR se expresa con una etiqueta de fusión, el compañero de fusión puede escindirse antes de la exploración. Además de la exploración primaria descrita anteriormente, puede realizarse una exploración secundaria, para garantizar que ninguna de las secuencias seleccionadas codifican positivos falsos.

25 Generalmente, los ensayos inmunológicos son adecuados para la exploración descrita en el presente documento. Dichos ensayos son muy conocidos en la técnica y constituyen, por ejemplo, ensayos de ELISPOT, ELISA, FLISA y de membrana (por ejemplo, transferencias Western), micromatrices en filtros y FACS. Los ensayos pueden realizarse sin ninguna etapa de enriquecimiento previa, utilizando polipéptidos producidos a partir de las secuencias que codifican los pares V_H y V_L . En el caso de que el repertorio de los pares codificantes V_H y V_L sean pares homólogos, no se requiere enriquecimiento mediante, por ejemplo, presentación en fagos antes de la exploración.
30 Sin embargo, en la exploración de bibliotecas combinatorias, los inmunoensayos se realizan preferentemente en combinación con o después de métodos de enriquecimiento tales como presentación en fagos, presentación en ribosomas, presentación en superficies bacterianas, presentación en levaduras, presentación en virus de eucariotas, presentación de ARN o presentación covalente (revisado en FitzGerald, K., 2000. Drug Discov. Today 5, 253-258).

35 Las secuencias que codifican los pares V_H y V_L seleccionadas en la exploración, se someten generalmente a secuenciación y se analizan con respecto a la diversidad de las regiones variables. En particular la diversidad de las regiones CDR es de interés, pero también es de interés la representación de la familia V_H y V_L . Basándose en estos análisis, se seleccionan secuencias que codifican los pares V_H y V_L que representan la diversidad global de los anticuerpos de unión a EGFR aislados de uno o más animales donantes. Preferentemente, se seleccionan secuencias con diferencias en todas las regiones CDR (CDRH1, CDRH2, CDRH3 y CDRL1, CDRL2 y CDRL3). Si hay secuencias con una o más regiones CDR idénticas o muy similares que pertenecen a familias diferentes de V_H o V_L , también se seleccionan. Preferentemente, al menos la región CDR3 de la cadena pesada variable (CDRH3) se diferencia entre los pares de secuencias seleccionados. Posiblemente, la selección de pares de secuencias V_H y V_L puede basarse solemnemente en la variabilidad de la región CDRH3. Durante el cebado y amplificación de las secuencias, pueden producirse mutaciones en las regiones marco conservadas de la región variable, en particular en la primera región marco conservada. Preferentemente, los errores que se producen en la primera región marco conservada se corrigen para garantizar que las secuencias corresponden completamente, o al menos, a un 98 % con respecto a las del origen de la línea germinal, por ejemplo, de tal manera que las secuencias V_H y V_L sean completamente murinas.
45

50 Cuando se garantiza que la diversidad global del conjunto de secuencias seleccionadas que codifican los pares de V_H y V_L es altamente representativa de la diversidad observada a nivel genético en una respuesta humoral contra una inmunización con EGFR, se espera que la especificidad global de los anticuerpos expresados a partir de un conjunto de pares codificantes de V_H y V_L seleccionados también sea representativa con respecto a la especificidad de los anticuerpos producidos en los animales inmunizados con EGFR. Una indicación de si la especificidad de los anticuerpos expresados a partir de un conjunto de pares codificantes de V_H y V_L seleccionados es representativa de
55

la especificidad de los anticuerpos suscitados por donantes, puede obtenerse comparando los títulos de los anticuerpos contra los antígenos seleccionados de la sangre del donante con la especificidad de los anticuerpos expresados a partir de un conjunto seleccionado de pares codificantes de V_H y V_L . Adicionalmente, posteriormente puede analizarse la especificidad de los anticuerpos expresados a partir de un conjunto de pares codificantes de V_H y V_L seleccionados. El grado de especificidad se correlaciona con el número de antígenos diferentes contra los cuales puede detectarse la reactividad de unión. La especificidad de los anticuerpos individuales expresados a partir de un conjunto seleccionado de pares codificantes de V_H y V_L puede analizarse por mapeo epitópico.

El mapeo epitópico puede realizarse mediante diversas metodologías, que no se excluyen entre sí necesariamente. Una manera de mapear la especificidad epitópica de una molécula de anticuerpo es evaluar la unión con péptidos de diversas longitudes procedentes de la estructura primaria del antígeno diana. Dichos péptidos pueden ser tanto lineales como conformacionales y pueden usarse en diversos formatos de ensayo, incluyendo ELISA, FLISA y resonancia de plasmón superficial (SPR, Biacore, FACS). Adicionalmente, los péptidos pueden seleccionarse lógicamente usando datos disponibles de estructuras y secuencias que representan, por ejemplo, regiones extracelulares o regiones conservadas del antígeno diana, o pueden diseñarse como un panel de péptidos solapantes que representan una parte seleccionada o todo el antígeno (Meloan RH, Puijk WC, Schaaper WMM. Epitope mapping by PEPSCAN. In: Immunology Methods Manual. Ed Iwan Lefkovits 1997, Academic Press, págs. 982-988). La reactividad específica de un clon de anticuerpo con uno o más de dichos péptidos generalmente será un indicativo de la especificidad epitópica. Sin embargo, los péptidos son, en muchos casos, malos miméticos de los epítomos reconocidos por anticuerpos suscitados contra antígenos proteicos, debido tanto a la ausencia de conformación natural o específica como al área de superficie de interacción enterrada, generalmente más grande, entre un anticuerpo y un antígeno proteico, en comparación con un antígeno y un péptido. Un segundo método para realizar el mapeo epitópico, que permite la definición de especificidades directamente sobre el antígeno proteico, es mediante enmascaramiento epitópico selectivo usando anticuerpos existentes, bien definidos. La afinidad reducida de un segundo anticuerpo de sondeo contra el antígeno después de bloqueo es generalmente indicativa de epítomos compartidos o solapantes. El mapeo epitópico mediante enmascaramiento selectivo puede realizarse mediante diversos inmunoensayos, incluyendo, pero sin limitación, ELISA y Biacore, que son muy conocidos en la técnica (por ejemplo, Ditzel *et al.* 1997. J. Mol. Biol. 267:684-695; Aldaz-Carroll *et al.* 2005. J. Virol. 79: 6260-6271). Incluso otro posible método para la determinación de la especificidad epitópica de anticuerpos contra EGFR es la selección de mutantes de escape en presencia del anticuerpo. Esto puede realizarse, por ejemplo, usando un barrido con alanina. La secuenciación de uno o más genes de interés a partir de dichos mutantes de escape generalmente revelará qué aminoácidos en el antígeno o antígenos son importantes para el reconocimiento por el anticuerpo y por tanto constituyen el epítipo (forman parte del mismo).

Producción de una composición de anticuerpos contra EGFR a partir de pares codificantes V_H y V_L seleccionados

Una composición de anticuerpos de la presente invención puede producirse a partir de una línea celular de expresión policlonal en un biorreactor, o en algunos biorreactores, o equivalentes de los mismos. Siguiendo esta estrategia los anticuerpos contra EGFR pueden purificarse del reactor como una sola preparación sin tener que separar los miembros individuales que constituyen la composición de anticuerpos contra EGFR durante el proceso. Si la composición de anticuerpos se produce en más de un biorreactor, la composición de anticuerpos contra EGFR purificada puede obtenerse agrupando los anticuerpos obtenidos de sobrenadantes purificados individualmente de cada biorreactor.

En los documentos WO 2004/061104 y WO 2006/007850 se describe una manera de producir una composición de anticuerpos recombinantes. El método descrito en el presente documento, se basa en una integración específica de sitio de la secuencia codificante del anticuerpo en el genoma de las células hospedadoras del individuo, garantizando que las cadenas proteicas V_H y V_L se mantienen en su emparejamiento original durante la producción. Además, la integración específica de sitio minimiza los efectos de posición y por lo tanto se espera que las propiedades de crecimiento y expresión de las células individuales en la línea celular policlonal sean muy similares. Generalmente, el método implica lo siguiente: i) una célula hospedadora con uno o más sitios de reconocimiento de recombinasa; ii) un vector de expresión con al menos un sitio de reconocimiento de recombinasa compatible con el de la célula hospedadora; iii) la generación de un conjunto de vectores de expresión transfiriendo los pares codificantes V_H y V_L seleccionados desde el vector de exploración a un vector de expresión, de tal manera que pueda expresarse un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de anticuerpo desde el vector (dicha transferencia puede no ser necesaria si el vector de exploración es idéntico al vector de expresión); iv) transfección de la célula hospedadora con el conjunto de vectores de expresión y un vector que codifica una recombinasa capaz de combinar los sitios de reconocimiento de recombinasa en el genoma de la célula hospedadora con los del vector; v) obtener/generar una línea celular policlonal a partir de la célula hospedadora transfectada y vi) expresar y recoger la composición de anticuerpos de la línea celular policlonal.

Cuando se usa un número pequeño de anticuerpos (2-3 o más) para una composición, estos pueden expresarse y purificarse individualmente de una manera similar a la fabricación de los anticuerpos monoclonales, por ejemplo como se describe en el documento WO 2004/085474. Los anticuerpos purificados pueden mezclarse después de la purificación o envasarse en viales individuales para mezclar antes de la administración o para una administración individual.

Preferentemente se utilizan células de mamífero, tales como células CHO, células COS, células BHK, células de mieloma (por ejemplo, células Sp2/0 o NS0), fibroblastos tales como NIH 3T3 y células humanas inmortalizadas, tales como células HeLa, células HEK 293 o PER.C6. Sin embargo, también pueden emplearse células eucariotas que no son de mamífero o procariotas, tales como células vegetales, células de insecto, células de levadura, hongos, *E. coli*, etc. Una célula hospedadora adecuada comprende uno o más sitios de reconocimiento de recombinasa adecuados en su genoma. La célula hospedadora también debe contener un modo de selección que esté unido operativamente al sitio de integración, para poder seleccionar integrantes (es decir, células que tienen una copia integrada de un vector de expresión o fragmento de un vector de expresión del Ab contra EGFR en el sitio de integración). La preparación de células que tienen un sitio FRT en una localización predeterminada en el genoma se describió, por ejemplo, en el documento US 5.677.177. Preferentemente, una célula hospedadora tiene únicamente solo un sitio de integración, que se localiza en un sitio que permite una alta expresión del integrante (un denominado punto caliente).

Un vector de expresión adecuado comprende un sitio de reconocimiento de recombinación que coincide con uno o más sitios de reconocimiento de recombinasa de la célula hospedadora. Preferentemente el sitio de reconocimiento de recombinasa está ligado a un gen de selección adecuado diferente del gen de selección usado para la construcción de la célula hospedadora. En la técnica se conocen bien genes de selección, y se incluyen, el gen de la glutamina sintetasa (GS), el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) y el de la neomicina, pudiendo la GS o la DHFR usarse para la amplificación génica de la secuencia V_H y V_L insertada. El vector también puede contener dos sitios de reconocimiento de recombinasa diferentes para permitir el intercambio de casetes mediado por recombinasa (RMCE, del inglés *Recombinase-Mediated Cassette Exchange*) de la secuencia codificante del anticuerpo en lugar de la integración completa del vector. El RMCE se describe en Langer *et al* 2002; Schlake y Bode 1994. En la técnica se conocen bien sitios de reconocimiento de recombinasa adecuados, e incluyen sitios FRT, lox y attP/attB. Preferentemente, el vector de integración es un vector que codifica un isotipo, en el que las regiones constantes (que incluyen preferentemente intrones) están presentes en el vector antes de transferir el par codificante V_H y V_L desde el vector de exploración (o las regiones constantes ya están presentes en el vector de exploración si dicha exploración se realiza sobre anticuerpos de longitud completa). Las regiones constantes presentes en el vector pueden ser la región constante de cadena pesada entera (CH_1 a CH_3 o a CH_4) o la región constante que codifica la parte Fc del anticuerpo (CH_2 a CH_3 o a CH_4). La región constante Kappa o Lambda de cadena ligera también puede estar presente antes de la transferencia. La elección del número de regiones constantes presentes, si hubiera, depende del sistema de exploración y de transferencia que se utilice. Las regiones constantes de cadena pesada pueden seleccionarse de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD e IgE. Los isotipos preferidos son IgG1, IgG2 y/o IgG3. Adicionalmente, el vector de expresión para la integración específica de sitio del ácido nucleico que codifica el anticuerpo contra EGFR contiene promotores adecuados o secuencias equivalentes que dirigen niveles de expresión altos de cada una de las cadenas V_H y V_L . La Figura 4 ilustra una posible forma para diseñar el vector de expresión, aunque son posibles numerosos diseños distintos.

La transferencia de los pares codificantes V_H y V_L seleccionados a partir del vector de exploración puede realizarse mediante escisión con enzimas de restricción convencionales y ligamiento, de tal manera que cada molécula de vector de expresión contiene un par codificante V_H y V_L . Preferentemente, los pares codificantes V_H y V_L se transfieren individualmente, sin embargo, si se desea, también pueden transferirse en masa. Cuando todos los pares codificantes V_H y V_L seleccionados se transfieren al vector de expresión, se obtiene una colección o una biblioteca de vectores de expresión. Si se desea, también pueden usarse formas de transferencia alternativas. Si el vector de exploración es idéntico al vector de expresión, la biblioteca de vectores de expresión está constituida por los pares de secuencias V_H y V_L seleccionados durante la exploración, que están situados en el vector de exploración/expresión.

En la técnica se conocen métodos de transfección de una secuencia de ácido nucleico en una célula hospedadora. Para garantizar la integración específica de sitio, también debe proporcionarse una recombinasa adecuada a la célula hospedadora. Esto se realiza preferentemente por cotransfección de un plásmido que codifica la recombinasa. Son recombinasas adecuadas, por ejemplo, Flp, Cre o la integrasa del fago Φ C31, usadas junto con un sistema de célula hospedadora/vector con los sitios de reconocimiento de recombinasa correspondientes. La célula hospedadora puede transfectarse en masa, lo que significa que la biblioteca de vectores de expresión se transfecta en la línea celular en una sola reacción obteniendo de este modo una línea celular policlonal. Como alternativa, la colección de vectores de expresión puede transfectarse individualmente en la célula hospedadora, generando de este modo una colección de líneas celulares individuales (cada línea celular produce un anticuerpo con una especificidad particular). Las líneas celulares generadas después de la transfección (individual o policlonal) se seleccionan después para integrantes específicos de sitio, y se adaptan para el crecimiento en suspensión y en medios asépticos, si aún no tienen estas propiedades antes de la transfección. Si la transfección se realiza individualmente, las líneas celulares individuales se analizan adicionalmente con respecto a sus propiedades de crecimiento y producción de anticuerpos. Preferentemente, se seleccionan líneas celulares con tasas de proliferación y niveles de expresión de anticuerpos similares para la generación de la línea celular policlonal. La línea celular policlonal se genera después mezclando las líneas celulares individuales en una proporción predefinida. Generalmente, a partir de la línea celular policlonal, se establece un banco de células maestras policlonales (pMCB), un banco de células de investigación policlonales (pRCB) y/o un banco de células de trabajo policlonales (pWCB). La línea celular policlonal se genera mezclando las líneas celulares individuales en una proporción predefinida. La

línea celular policlonal se distribuye en ampollas generando de este modo un banco de células de investigación policlonales (pRCB) o un banco de células maestro policlonales (pMCB) a partir del cual puede generarse un banco de células de trabajo policlonales (pWCB) expandiendo células desde el banco de células de investigación o maestro. El banco de células de investigación es principalmente para estudios preliminares, en los que la línea celular policlonal puede no comprender tantos anticuerpos individuales como la línea celular policlonal en el banco de células maestro. Normalmente, el pMCB se expande adicionalmente para establecer un pWCB con fines de producción. Una vez agotada el pWCB una nueva ampolla del pMCB puede expandirse para establecer un nuevo pWCB.

Una realización de la presente invención es una línea celular policlonal capaz de expresar una composición de anticuerpos contra EGFR recombinantes de la presente invención.

Adicionalmente, en el presente documento se describe una línea celular policlonal donde cada célula individual puede expresar un solo par codificante V_H y V_L , y la línea celular policlonal, en su totalidad, puede expresar una colección de pares codificantes V_H y V_L donde cada par V_H y V_L codifica un anticuerpo contra EGFR. Preferentemente la colección de pares codificantes V_H y V_L son pares homólogos generados de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

Una composición de anticuerpos recombinantes de la presente invención puede fabricarse cultivando una ampolla a partir de un pWCB en un medio apropiado durante un período de tiempo que permita la expresión suficiente de anticuerpos y donde la línea celular policlonal permanezca estable (la ventana es de aproximadamente entre 15 días y 50 días). Pueden utilizarse métodos de cultivo tales como alimentación por lotes o perfusión. La composición de anticuerpos recombinantes se obtiene a partir del medio de cultivo y se purifican mediante técnicas de purificación convencionales. La cromatografía por afinidad combinada con etapas de purificación posteriores, tal como cromatografía de intercambio iónico, interacciones hidrófobas y filtración en gel se han usado frecuentemente para la purificación de IgG. Después de la purificación, se evalúa la presencia de todos los miembros individuales en la composición de anticuerpos policlonales, por ejemplo, mediante cromatografía de intercambio iónico. La caracterización de dicha composición de anticuerpos se describe con detalle en el documento WO 2006/007853.

Un método alternativo para expresar una mezcla de anticuerpos en una célula recombinante se describe en el documento WO 2004/009618. Este método produce anticuerpos con diferentes cadenas pesadas asociadas con la misma cadena ligera a partir de una sola línea celular. Esta estrategia puede aplicarse si la composición de anticuerpos contra EGFR se produce a partir de una biblioteca combinatoria.

Composiciones terapéuticas

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende, como principio activo, una composición de anticuerpos contra EGFR o un Fab recombinante contra EGFR u otro fragmento de anticuerpo recombinante contra EGFR, o una molécula de unión biespecífica de la invención. Preferentemente, el principio activo de dicha composición es una composición de anticuerpos recombinantes contra EGFR como se describe en la presente invención. Dichas composiciones pretenden mejorar y/o prevenir y/o tratar el cáncer. Preferentemente, la composición farmacéutica se administra a un ser humano, a un animal doméstico o a una mascota.

La composición farmacéutica comprende adicionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Una composición de anticuerpos contra EGFR o fragmentos de los anticuerpos de la misma, puede administrarse en un diluyente, transportador o excipiente farmacéuticamente aceptable, en forma de dosificación unitaria. Puede emplearse la práctica farmacéutica convencional para proporcionar formulaciones o composiciones adecuadas para administrar a los pacientes con cáncer. En una realización preferida, la administración es terapéutica, lo que significa que se administra después de haberse diagnosticado una afección cancerosa. Puede emplearse cualquier vía de administración adecuada, por ejemplo, la administración puede ser parenteral, intravenosa, intraarterial, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, mediante administración en aerosol, supositorios u oral. Por ejemplo, las formulaciones farmacéuticas pueden estar en forma de soluciones o suspensiones líquidas. Para la administración oral, se requiere protección contra la degradación en el estómago. Para las formulaciones intranasales, los anticuerpos pueden administrarse en forma de polvos, gotas nasales o aerosoles.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se preparan de una manera de por sí conocida, por ejemplo, mediante procesos de elaboración por disolución, liofilización, mezclado, granulación convencionales. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional (véase, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20.^a ed.), ed. A. R. Gennaro, 2000, Lippincott Williams y Wilkins, Philadelphia, PA and Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick y J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, Nueva York, NY).

Preferentemente se usan soluciones o suspensiones del principio activo y especialmente soluciones o suspensiones isotónicas acuosas para preparar las composiciones farmacéuticas de la presente invención. En el caso de composiciones liofilizadas que comprenden el principio activo en solitario o junto con un transportador, por ejemplo

manitol, dichas soluciones o suspensiones pueden producirse, si es posible, antes de su uso. Las composiciones farmacéuticas pueden esterilizarse y/o pueden comprender excipientes, por ejemplo, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes y/o emulsionantes, solubilizantes, sales para regular la presión osmótica y/o tampones y se preparan de una manera de por sí conocida, por ejemplo, mediante procesos de disolución o liofilización convencionales. Dichas soluciones o suspensiones pueden comprender sustancias aumentadoras de la viscosidad, tal como carboximetilcelulosa sódica, carboximetilcelulosa, dextrano, polivinilpirrolidona o gelatina.

Las composiciones para inyección se preparan de una manera habitual en condiciones estériles; lo mismo se aplica también para introducir las composiciones en ampollas o viales y para el sellado de los envases.

Las composiciones farmacéuticas comprenden de aproximadamente 1 % a aproximadamente 95 %, preferentemente de aproximadamente 20 % a aproximadamente 90 % de principio activo. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden estar, por ejemplo, en forma de dosis unitaria, tal como en forma de ampollas, viales, supositorios, comprimidos, píldoras o cápsulas. Las formulaciones pueden administrarse a individuos humanos en cantidades terapéutica o profilácticamente eficaces (por ejemplo cantidades que previenen, eliminan o reducen una afección patológica) para proporcionar terapia para una enfermedad o afección. La dosificación preferida del agente terapéutico a administrar depende probablemente de dichas variables y de la gravedad del cáncer, del estado de salud general del paciente particular, de la formulación de los excipientes del compuesto y su vía de administración.

Usos terapéuticos de las composiciones de acuerdo con la invención

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención pueden usarse para el tratamiento o mejora de una enfermedad en un mamífero. Las afecciones que pueden tratarse o prevenirse con las composiciones farmacéuticas de la presente invención, incluyen la prevención y el tratamiento de pacientes con cáncer que pueden someterse, preferentemente, a tratamiento terapéutico con una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención.

Las composiciones proporcionadas en el presente documento son para su uso en la prevención, tratamiento o mejora de uno o más síntomas asociados con cáncer en un mamífero.

Una realización adicional de la presente invención es el uso de una composición de anticuerpos recombinantes contra EGFR de la presente invención para la preparación de una composición para el tratamiento, mejora o prevención de uno o más síntomas asociados con cáncer en un mamífero.

Preferentemente, el mamífero en las realizaciones anteriores es un ser humano, un animal doméstico o una mascota.

Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención están indicados en el tratamiento de determinados tumores sólidos. Basándose en diversos factores, incluyendo los niveles de expresión de EGFR, entre otros, los siguientes tipos de tumores parecen presentar indicaciones preferidas: de mama, de ovario, de colon, de recto, de próstata, de vejiga, de páncreas, de cabeza y cuello y cáncer pulmonar no microcítico. En relación con cada una de estas indicaciones, tres rutas clínicas parecen ofrecer distintas posibilidades para una satisfacción clínica:

Terapia adyuvante: en la terapia adyuvante, los pacientes deben tratarse con anticuerpos de acuerdo con la presente invención en combinación con un agente quimioterapéutico o antineoplásico y/o con radioterapia. Las dianas principales indicadas anteriormente se tratarán bajo protocolo mediante la adición de anticuerpos de la invención para una terapia de primera y segunda línea convencional. Los diseños de protocolo abordarán la eficacia, evaluada por reducción en la masa tumoral así como por la capacidad para reducir dosis habituales de quimioterapia convencional. Estas reducciones de la dosificación permitirán una terapia adicional y/o prolongada reduciendo la toxicidad relacionada con la dosis del agente quimioterapéutico. Los anticuerpos contra EGFR de la técnica anterior, se han utilizado, o se están utilizando, en diversos ensayos clínicos con adyuvantes en combinación con los agentes quimioterapéuticos o antineoplásicos adriamicina (Erbitux: carcinoma de próstata avanzado), cisplatino (Exbitux: carcinomas de cabeza y cuello y de pulmón avanzados), taxol (Erbitux: cáncer de mama) y doxorubicina (Erbitux).

Adicionalmente se describen artículos farmacéuticos que comprenden una composición de anticuerpos de la invención y al menos un compuesto que puede inducir la diferenciación de células cancerosas como una combinación para la administración simultánea, individual o sucesiva en carcinoterapia. Combinando las composiciones de anticuerpos de la invención con agentes que se sabe que inducen la diferenciación terminal de las células cancerosas, el efecto puede mejorarse adicionalmente.

El al menos un compuesto puede seleccionarse del grupo que consiste en ácido retinoico, ácidos trans-retinoicos, ácidos cis-retinoicos, fenilbutirato, factor de crecimiento nervioso, dimetil sulfóxido, vitamina D(3) forma activa, receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas, 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato, hexametileno-bis-acetamida, factor beta de crecimiento transformante, ácido butírico, AMP cíclico y vesnarinona. Preferentemente, el

compuesto se selecciona del grupo que consiste en ácido retinoico, fenilbutirato, todos los ácidos trans-retinoicos, vitamina D forma activa.

5 Los artículos farmacéuticos que comprenden una composición de anticuerpos de la invención y al menos un compuesto quimioterapéutico o antineoplásico pueden usarse como una combinación para la administración simultánea, individual o sucesiva en carcinoterapia. El compuesto quimioterapéutico puede seleccionarse del grupo que consiste en adriamicina, cisplatino, taxol, doxorubicina, topotecán, fluoropirimidina, oxaliplatino e irinotecán.

10 Monoterapia: en relación con el uso de los anticuerpos de acuerdo con la presente invención en monoterapia de tumores, los anticuerpos pueden administrarse a pacientes sin un agente quimioterapéutico o antineoplásico. Los resultados preclínicos generados a través del uso de anticuerpos de acuerdo con la presente invención y analizados en el presente documento han demostrado resultados positivos como una terapia independiente.

15 Agentes formadores de imágenes: a través de la unión de un radionúclido (por ejemplo, itrio (^{90}Y)) con anticuerpos de acuerdo con la presente invención, se espera que los anticuerpos radiomarcados de acuerdo con la presente invención puedan utilizarse como un agente de diagnóstico, formador de imágenes. En dicho papel, los anticuerpos de la invención localizarán tumores tanto sólidos, así como lesiones metastásicas de células que expresan EGFR. En relación con el uso de los anticuerpos de la invención como agentes formadores de imágenes, los anticuerpos pueden usarse para ayudar en el tratamiento quirúrgico de tumores sólidos, tanto como una exploración prequirúrgica así como posoperatoria, seguido de determinar qué tumor persiste y/o reaparece. Un anticuerpo
20 (^{111}In)-Erbix se ha usado como un agente formador de imágenes en un ensayo clínico humano en Fase I en pacientes con carcinomas pulmonares de células escamosas no reseccionables. (Divgi *et al.* J. Natl. Cancer Inst. 83: 97-104 (1991). Los pacientes se examinaron con una cámara gamma de proyección anterior y posterior convencional. Los datos preliminares indicaron que se identificaron todas las lesiones primarias y las lesiones metastásicas grandes, mientras que solo se detectó la mitad de las lesiones metastásicas pequeñas (menores de 1
25 cm).

30 Los inhibidores de tirosina quinasa (TKI) son moléculas sintéticas, de bajo peso molecular, derivadas principalmente de quinazolina, que interactúan con el dominio de receptores de tirosina quinasa intracelular e inhiben la fosforilación del receptor inducida por ligando compitiendo por el sitio de unión Mg-ATP intracelular. Diversos TKI en desarrollo clínico, incluyendo Gefitinib (Iressa, ZD1839), Erlotinib (Tarceva, OSI-774), Lapatinib, (Tykerb, GW572016), Canertinib (CI-1033), EKB-569 y PKI-166 actúan sobre EGFR. El tratamiento de combinación de los TKI y contra EGFR ha demostrado ser beneficioso tanto *in vivo* como *in vitro* contra células cancerosas dependientes de EGFR. Los artículos farmacéuticos que comprenden una composición de anticuerpos de la invención y al menos un TKI que actúan sobre EGFR pueden usarse como una combinación para la administración simultánea, individual o sucesiva en carcinoterapia. Adicionalmente, los inhibidores de molécula pequeña incluyen: Sorafinib (raf y RTK múltiples), Sunitinib (RTK Múltiples), Temsirolimus (mTOR), RAD001 (mTOR) y AZD217 (VEGFR2).

40 Las composiciones de anticuerpos de la presente invención pueden usarse en combinación con otros agentes terapéuticos basados en anticuerpos. Los ejemplos de estos incluyen, por ejemplo, anticuerpos contra HER2 (Herceptina) y VEGF (Avastin). Las composiciones de anticuerpos de la presente invención pueden usarse en combinación con un agente que se sabe que estimula células del sistema inmunitario, conduciendo dicho tratamiento de combinación a potenciar la mejora mediada por el sistema inmunitario de la eficacia de las
45 composiciones de anticuerpos de la invención. Los ejemplos de dichos agentes inmunoestimuladores incluyen, pero sin limitación, interleucinas (por ejemplo IL-21 e IL-2) recombinantes.

Dosis y vías de administración

50 Aunque aún no se ha determinado la dosificación específica para los anticuerpos de acuerdo con la invención, comparando con el producto similar (ImClone C225 (Erbix)) que se ha aprobado, pueden determinarse algunas cuestiones en cuanto a la dosificación. El anticuerpo C225 se administra típicamente con dosis en el intervalo de 5 a 400 mg/m², usándose solo dosis más bajas en relación con los estudios de seguridad. Por consiguiente, podría esperarse que la dosificación en pacientes con anticuerpos de acuerdo con la invención pueda estar en este
55 intervalo o en un intervalo más bajo, quizá en el intervalo de 50 a 300 mg/m², y siga siendo eficaz. La dosificación en mg/m², a diferencia de la medición convencional de dosis en mg/kg, es una medición basada en el área superficial y es una medición de dosificación conveniente que se diseña para incluir a pacientes de todas las estaturas, desde bebés a adultos.

60 La información de prescripción disponible para Erbitux (Cetuximab) incluye una infusión IV inicial de 120 minutos de 400 mg/m², seguida de infusiones semanales de 60 min de 250 mg/m². Estas dosificaciones se recomiendan para tratamiento individual así como para combinación con radioterapia. Para Vectibix (panitumumab) la dosis recomendada es de 6 mg/kg administrada durante 60 minutos cada 14 días.

65 La dosificación clínica esperada del anticuerpo HuMaxEGFr de Genmab (zumutumumab) es una dosis inicial de 8 mg/kg de HuMax-EGFr, seguida de infusiones semanales de una dosis de mantenimiento hasta la progresión de la

enfermedad. La dosis de mantenimiento se ajustará, según sea necesario, hasta que el paciente desarrolle una erupción cutánea limitante de la dosis, hasta una dosis máxima de 16 mg/kg de HuMax-EGFr (Dosificaciones para un estudio principal en Fase III, disponible en la descripción del producto de Genmab).

5 La dosificación clínica de las composiciones de anticuerpos de la presente invención están posiblemente limitadas por el grado de erupción cutánea observado con los anticuerpos contra EGFR monoclonales (Erbix y Vectibix) usados en la clínica actualmente. Los datos de un estudio toxicológico de 6 semanas en monos *Cynomolgus* no mostraron síntomas de erupción cutánea cuando una composición de anticuerpos de la invención se administró a una dosis equivalente a la que se usa para el tratamiento con uno de los anticuerpos monoclonales usado en la
10 clínica (ejemplo 20). Por tanto, las composiciones de anticuerpos de la invención pueden administrarse por vía intravenosa y con una dosificación semanal de 250 mg/m², que se traduce en 7,5 mg/kg para un ser humano con una superficie corporal de 1,8 m² y un peso corporal de 60 kg. Adicionalmente, puede darse una dosis de carga inicial de 400 mg/m² (que se traduce en 12 mg/kg para un ser humano con una superficie corporal de 1,8 m² y un peso corporal de 60 kg) antes de la dosificación semanal posterior.

15 Se espera que sean útiles tres estrategias de suministro distintas para suministrar los anticuerpos de acuerdo con la invención. El suministro intravenoso convencional será, presumiblemente, la técnica de suministro convencional para la mayoría de los tumores. Sin embargo, en relación con tumores en la cavidad peritoneal, tales como tumores de los ovarios, conducto biliar, otros conductos y similar, la administración intraperitoneal puede demostrar ser favorable para obtener una dosis alta del anticuerpo en el tumor y minimizar la eliminación del anticuerpo. De una manera similar, determinados tumores sólidos poseen vasculatura que es apropiada para una perfusión regional. La perfusión regional permitirá la obtención de una dosis alta del anticuerpo en el lugar de un tumor y minimizará la eliminación a corto plazo del anticuerpo.

25 Al igual que con cualquier compuesto terapéutico basado en infusión de proteínas o anticuerpos, las cuestiones de seguridad están relacionadas principalmente con (i) el síndrome de liberación de citocinas, es decir hipotensión, fiebre, convulsiones, escalofríos (ii) el desarrollo de una respuesta inmunogénica contra el material (es decir, el desarrollo de anticuerpos humanos por el paciente contra el compuesto terapéutico, o respuesta HAMA o HACA) y (iii) toxicidad contra células normales que expresan el receptor de EGF, por ejemplo hepatocitos que expresan EGFR. Se utilizarán ensayos convencionales y de seguimiento para monitorizar cada una de estas cuestiones de seguridad. En particular, la función hepática se monitorizará frecuentemente durante ensayos clínicos para evaluar daños en el hígado, si hubiera.

35 *Uso diagnóstico*

Adicionalmente se describen kits de diagnóstico. Los kits pueden comprender una composición de anticuerpos contra EGFR de acuerdo con la invención cuya proteína puede marcarse con un marcador detectable, o no marcarse, para una detección sin marcador. El kit puede usarse para identificar individuos que padecen cáncer asociado con sobreexpresión de EGFR.

40 **Ejemplos**

Ejemplo 1 Clonación de anticuerpos contra EGFR

45 *Inmunizaciones*

Se utilizaron ratones hembra BALB/c, cepa A, o C57B16 (de 8 a 10 semanas de vida) para inmunizaciones mediante inyecciones con diferentes proteínas purificadas además de células que sobreexpresan EGFR.

50 Para algunas de las inmunizaciones se usaron proteínas de EGFR disponibles en el comercio (R y D Systems cat n.º 1095-ER o Sigma n.º E3641). Para otras de las inmunizaciones se usaron el EGFR humano recombinante y el EGFRvIII, producidos como proteínas de fusión, que consistían en el ECD de EGFR o de EGFRvIII y la hormona de crecimiento humana (hGH), incluyendo también un sitio de escisión para el virus del grabado del tabaco (TEV, por las siglas en inglés *Tobacco Etch Virus*) además de una etiqueta de His descrita en el Ejemplo 10b. En algunos casos, el ECD de EGFR se aisló mediante escisión con proteasas del TEV y posterior purificación en una columna de níquel.

60 La línea celular humana de cáncer de cabeza y cuello, HN5 (Easty DM, Easty GC, Carter RL, Monaghan P, Butler LJ. *Br J Cancer*. Jun 1981; 43 (6): 772-85. Diez líneas de células de carcinoma humano procedentes de carcinomas escamosos de la cabeza y cuello) que expresaba aproximadamente 10⁷ receptores/célula se usó para las inmunizaciones basadas en células. Las células se cultivaron en medio DMEM complementado con FBS (suero bovino fetal) al 10 %, glicerol 3 mM, piruvato sódico 5 mM y penicilina estreptomycinina al 1 %. Antes de cada inmunización las células se lavaron en PBS, se tripsinizaron con TrypLE y se resuspendieron en medio de crecimiento. Posteriormente las suspensiones celulares se lavaron dos veces en PBS por centrifugación a 250xg durante 5 min, se desprendieron y se resuspendieron en PBS estéril 15 ml.

Las células o antígenos se diluyeron en PBS y después se mezclaron a una proporción 1: 1 con adyuvante de Freund. El adyuvante se usó para potenciar y modular la respuesta inmunitaria. Para la primera inmunización se utilizó adyuvante completo de Freund (CFA) mientras que para inmunizaciones posteriores se utilizó adyuvante incompleto de Freund (IFA). El IFA es una emulsión de aceite en agua compuesta de aceites minerales y el CFA es IFA al cual se añaden especies de *Mycobacterium* deshidratadas, termodestruidas. Ambos adyuvantes tienen efecto depósito. El CFA da lugar a una persistencia prolongada de la respuesta inmunitaria y se usa para primeras inmunizaciones para reforzar la respuesta inmunitaria y el IFA se usa para inmunizaciones posteriores. Las emulsiones se ensayaron añadiendo una gota sobre la superficie de un vaso con agua. Si la gota permanece como una gota, la emulsión es estable y las inyecciones pueden realizarse. A los ratones solo se les administraron emulsiones estables.

Dependiendo del programa (véase la Tabla 2), para cada inyección se usaron 25-100 μg de antígeno o 10^7 células. En total, los ratones recibieron 4 inyecciones. Todos los ratones recibieron inyecciones de 300 μl o 200 μl de emulsión. Dependiendo del programa, las inyecciones se realizaron por vía subcutánea (s.c.), intraperitoneal (i.p.) o intravenosa (i.v.).

Al final, los ratones se sacrificaron por luxación cervical y se extirparon los bazo y se transfirieron a un tamiz celular de 74 μm (Corning n.º 136350-3479). Las células se maceraron a través del filtro, se resuspendieron en RPMI 1640 enfriado con FBS al 10 % y se centrifugaron a 300xg durante 5 minutos. El sedimento celular se resuspendió en RPMI 1640 con FBS al 1 %, se filtraron a través de un filtro de jeringa de 50 μm (BD n.º 340603) y se recogieron por centrifugación. El sedimento celular se crioconservó después de la resuspensión en FCS con DMSO al 10 % y las células congeladas se conservaron a - 80 °C hasta su separación por FACS.

Separación por FACS de células plasmáticas murinas

Viales con esplenocitos congelados se descongelaron a 37 °C y se transfirieron a tubos de 15 ml que aún contenían hielo. Gota a gota, se añadieron al tubo 10 ml de RPMI enfriado con hielo con FBS (suero bovino fetal) al 10 % al mismo tiempo que se agitaba. Después de un lavado en PBS FACS 10 ml, se añadieron 5 ml de PBS FCS antes de filtrar las células a través de un Filcon de 50 μm . Después, las células se sedimentaron y se resuspendieron en PBS 1 ml con FBS al 2 % (volumen final) y se tiñeron con anti-CD43-FITC y anti-CD138-PE de acuerdo con la dilución específica a una concentración final de aprox. 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las células se incubaron a 4 °C durante 20 min en la oscuridad. Posteriormente, las células se lavaron 2 veces con tampón FACS 2 ml. Se añadieron hasta 15 ml de PBS FACS. Se añadió yoduro de propidio (PI) a 1:100 (1 parte de PI con respecto a 100 partes de tampón PBS FACS), y las células se separaron posteriormente en placas de PCR de 96 pocillos que contenían tampón de reacción de PCR (véase más adelante) y se centrifugaron durante 2 min a 400 xg antes de que las placas se congelasen a -80 °C. Se seleccionaron células plasmáticas como CD43-positivas/CD-138 positivas como se muestra en la *Figura 1*.

Ligamiento de pares V_H y V_L homólogos

El ligamiento de las secuencias codificantes de V_H y V_L se realizó en las células sencillas seleccionadas como células plasmáticas, facilitando el emparejamiento homólogo de las secuencias codificantes de V_H y V_L . El procedimiento utilizó un procedimiento de PCR de dos etapas basándose en una RT-PCR de extensión solapante Multiplex de una etapa seguido por una PCR anidada. Las mezclas de cebadores usadas en el presente ejemplo sólo amplifican cadenas ligeras Kappa. Sin embargo, los cebadores que pueden amplificar las cadenas ligeras Lambda pueden añadirse, si se desea, a la mezcla de cebadores Multiplex y a la mezcla de cebadores de PCR anidada. Si se añaden cebadores Lambda, el procedimiento de separación debe adaptarse de tal manera que no se excluyan células positivas a Lambda. El principio del ligamiento de secuencias V_H y V_L homólogas se ilustra en la *Figura 2*.

Las placas de PCR de 96 pocillos producidas se descongelaron y las células separadas sirvieron como molde para la RT-PCR de extensión solapante Multiplex. El tampón de separación añadido a cada pocillo antes de la separación de células sencillas contenía tampón de reacción (Tampón de RT-PCR de una etapa; Qiagen), cebadores para RT-PCR (véase la Tabla 3) e inhibidor de RNasa (RNasin, Promega). Esto se complementó con una Mezcla Enzimática de RT-PCR de Una Etapa (25x dilución; Qiagen) y mezcla de los dNTP (200 μM de cada uno) para obtener la concentración final determinada en un volumen de reacción de 20 μl . Las placas se incubaron durante 30 min a 55 °C para permitir la transcripción inversa del ARN de cada célula. Después de la transcripción inversa, las placas se sometieron a ciclos de PCR siguientes: 10 min a 94 °C, 35x (40 s a 94 °C, 40 s a 60 °C, 5 min a 72 °C), 10 min a 72 °C.

Las reacciones de PCR se realizaron en un ciclador térmico H20BIT con una cesta Peel Seal para 24 placas de 96 pocillos (ABgene) para facilitar un alto rendimiento. Las placas de la PCR se conservaron a -20 °C después del ciclado.

Para la etapa de PCR anidada, se prepararon placas de PCR de 96 pocillos con la siguiente mezcla en cada pocillo (reacciones de 20 μl) para obtener una concentración final determinada: tampón 1x FastStart (Roche), mezcla de los dNTP (200 μM de cada uno), mezcla de cebador anidado (véase la Tabla 4), ADN Polimerasa Phusion (0,08 U;

Finnzymes) y combinación de enzimas de alta fidelidad FastStart (0,8 U; Roche). Como molde para la PCR anidada, se transfirió 1 µl desde las reacciones de PCR de extensión solapante Multiplex. Las placas de la PCR anidada se sometieron al siguiente termociclado: 35x (30 s a 95 °C, 30 s a 60 °C, 90 s a 72 °C), 10 min a 72 °C.

- 5 Se analizaron reacciones seleccionadas al azar en un gel de agarosa al 1 % para verificar la presencia de un fragmento de extensión solapante de aproximadamente 890 pares de bases (pb).

Las placas se conservaron a -20 °C hasta el procesamiento adicional de los fragmentos de la PCR.

- 10 Los repertorios de los pares codificantes V_H y V_L ligados de la PCR anidada se agruparon, sin pares de mezcla de diferentes donantes y se purificaron mediante electroforesis preparativa en gel de agarosa al 1 %. La secuencia codificante de la cadena ligera constante kappa humana se cortó y empalmó mediante extensión solapante con la región codificante V_L de los productos de la PCR agrupados de los pares codificantes V_H y V_L ligados (Figura 3). La secuencia codificante de la cadena ligera constante kappa humana se amplificó a partir de un plásmido que contenía la secuencia codificante de un anticuerpo humano con una cadena ligera kappa en una reacción que contenía:
- 15 Enzima Phusion (2 U; Finnzymes), tampón 1x Phusion, mezcla de los dNTP (200 µM de cada uno), cebador hKCForw-v2 y cebador Kappa3' (Tabla 5) y molde de plásmido pLL138 (10 ng/µl) en un volumen total de 50 µl. La reacción se sometió al siguiente termociclado: 25x (30 s a 95 °C, 30 s a 55 °C, 45 s a 72 °C), 10 min a 72 °C. El fragmento de la PCR resultante se purificó mediante electroforesis preparativa en gel de agarosa al 1 %.

- 20 Los fragmentos de la PCR agrupados purificados de cada repertorio se cortaron y empalmaron con el fragmento de la PCR amplificado y purificado de la región que codificaba la cadena constante kappa humana (Anexo 2) mediante el siguiente corte y empalme por PCR de extensión solapante (volumen total 50 µl) que contenía: el fragmento de la región codificante de la cadena constante kappa humana (1,4 ng/µl), el fragmento de la PCR agrupado purificado (1,4 ng/ml), la ADN polimerasa Phusion (0,5 U; Finnzymes) y la combinación de enzimas de alta fidelidad FastStart (0,2 U; Roche), Tampón 1x FastStart (Roche), mezcla de los dNTP (200 µM de cada uno), cebador mhKCreV y conjunto de cebadores mJH (véase la Tabla 5). La reacción se sometió al siguiente termociclado: 2 min a 95 °C, 25x (30 s a 95 °C, 30 s a 55 °C, 1 min a 72 °C), 10 min a 72 °C. El fragmento de la PCR resultante (aprox. 1070 pb) se purificó mediante electroforesis preparativa en gel de agarosa al 1 %.

30 *Inserción de pares codificantes V_H y V_L homólogos en un vector de exploración*

- Para identificar anticuerpos con especificidad de unión a EGFR, las secuencias codificantes V_H y V_L obtenidas se expresaron como anticuerpos de longitud completa. Esto implicó la inserción del repertorio de los pares codificantes V_H y V_L en un vector de expresión y la transfección en una célula hospedadora.
- 35

- Para la generación de un repertorio de vectores de expresión se empleó un procedimiento de clonación de dos etapas que contenía los pares codificantes V_H y V_L ligados. Estadísticamente, si el repertorio de vectores de expresión contiene plásmidos recombinantes hasta diez veces el número de productos PCR V_H y V_L emparejados afines usados para la generación del repertorio de exploración, hay una probabilidad del 99 % de que todos los pares génicos únicos estén representados. Por tanto, si se obtienen 400 fragmentos del gen V por extensión solapante, se genera un repertorio de al menos 4000 clones para la exploración.
- 40

- En resumen, los productos de la PCR purificados del repertorio de los pares codificantes V_H y V_L ligados, cortados y empalmados con la región codificante constante kappa humana, se escindieron con endonucleasas de ADN *XhoI* y *NotI* en los sitios de reconocimiento introducidos en los extremos de los productos PCR. Los fragmentos escindidos y purificados se ligaron en un vector de expresión de IgG de mamífero digerido con *XhoI/NotI*, OO-VP-002 (Figura 4) mediante procedimientos de ligamiento convencionales. La mezcla del ligamiento se sometió a electroporación en *E. coli* y se añadió a placas 2xYT que contenían el antibiótico apropiado y se incubaron a 37 °C durante una noche. El repertorio de vectores amplificados se purificó de las células recuperadas de las placas usando métodos de purificación de ADN convencionales (Qiagen). Los plásmidos se prepararon para la inserción de fragmentos promotor-líder por escisión usando endonucleasas *AscI* y *NheI*. Los sitios de restricción para estas enzimas se localizaban entre los pares de los genes codificantes de V_H y V_L . Después de la purificación del vector, se insertó un fragmento promotor-líder de mamífero bidireccional digerido con *AscI-NheI* en los sitios de restricción *AscI* y *NheI* mediante procedimientos de ligamiento convencionales. El vector ligado se amplificó en *E. coli* y el plásmido se purificó usando métodos convencionales. El repertorio de vectores de exploración generado se transformó en *E. coli* mediante procedimientos convencionales. Las colonias obtenidas se consolidaron en placas maestro de 384 pocillos y se conservaron. El número de colonias dispuestas superó al menos 3 veces el número de productos de la PCR de entrada, dando por tanto un 95 % por ciento de probabilidad para la presencia de todos los pares génicos V únicos obtenidos.
- 50
- 55
- 60

Exploración para la unión al dominio extracelular de EGFR

- En general, la exploración se realizó como un procedimiento en dos etapas. Las bibliotecas de anticuerpos se exploraron con un ensayo ELISA con respecto a la reactividad con la proteína EGFR recombinante, después de lo cual, se usó FMAT (FLISA) como una estrategia basada en células, con la línea celular NR6wtEGFR para la
- 65

detección de anticuerpos contra EGFR que se unen a EGFR expresado en la superficie celular. Para las bibliotecas 101 y 108/109 (Tabla 2) se realizó ELISA con EGFR recombinante que representa el dominio extracelular de EGFR.

En resumen, para el ensayo ELISA, placas Nunc Maxisorb (catálogo n.º 464718) se recubrieron con proteína 1 µg/ml (producidas internamente), se diluyeron en PBS a 4 °C durante una noche. Antes de bloquear en Leche-PBS-T al 2 % 50 µl, las placas se lavaron una vez con PBS + Tween 20 al 0,05 % (PBS-T). Las placas se lavaron una vez con PBS-T, se añadieron 20 µl de leche-PBS-T al 2 % y sobrenadantes 5 µl para transfectantes CHO-S FreeStyle (véase más adelante) y se incubó durante 1 hora ½ a TA después de lo cual las placas se lavaron una vez con PBS-T 20 µl por pocillo. Se añadió anticuerpo secundario (de cabra contra IgG humana conjugado con HRP, Jackson, catálogo n.º 109-035-097) diluido a 1:10000 en leche-PBS-T al 2 % para detectar los anticuerpos unidos en los pocillos y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron una vez en PBS-T antes de la adición de 25 µl de sustrato (Kem-en-tec Diagnostics, catálogo n.º 4390) que se incubó durante 5 min. Se añadieron 25 µl de ácido sulfúrico 1 M después de la incubación para detener la reacción. La señal específica se detectó en un lector ELISA a 450 nm.

Para la detección FMAT basada en células de anticuerpos contra EGFR, células SKBR-3 (ATCC n.º HTB-30) o NR6wtEGFR (Welsh *et al*, 1991, J Cell Biol, 114, 3, 533-543) se mantuvieron en medio de crecimiento como se ha descrito. Las células se contaron y se diluyeron a 125.000 células/ml con el anticuerpo de cabra contra IgG humana (H-L) conjugado con Alexa-647 (Molecular Probes n.º A21445, Lote n.º 34686A) diluido a 1:40.000. Un total de 20 µl de esta suspensión se transfirió a placas Nunc de fondo transparente de 384 pocillos. Posteriormente, se añadieron 10 µl de sobrenadante de transfección a las células. La señal FMAT para la reacción se midió después de 6-10 horas de incubación.

Los datos de la exploración indican que 221 (4,8 %) del total de clones fueron positivos en el ELISA. 93 (2,0 %) de esos clones también fueron positivos en FMAT. En total 220 (4,8 %) de los clones fueron positivos en el FMAT y entre esos 127 (220-93) únicamente positivos para el antígeno de superficie celular. La biblioteca 111 se exploró de una manera similar, pero dado que el procedimiento de inmunización se realizó para generar anticuerpos específicos para el receptor EGFR mutante de delección, EGFRvIII, las exploraciones ELISA incluyeron ensayos para detectar tanto el EGFR de tipo silvestre como el EGFRvIII. En el ELISA se identificaron siete clones que eran específicos para EGFRvIII y, de manera interesante, aquellos clones eran negativos para la tinción de células que expresaban EGFR de tipo silvestre en el FMAT. Se identificaron 13 clones que eran positivos para el EGFR de ts en FMAT y ELISA pero no para EGFRvIII, que eran exclusivos para esta biblioteca en comparación con las bibliotecas 101 y 108/109. Todos los clones positivos a ELISA se seleccionaron para análisis posterior.

35 *Análisis de secuencias y selección de clones*

Los clones identificados como específicos de EGFR en ELISA se recuperaron de las placas maestro originales (formato de 384 pocillos) y se consolidaron en nuevas placas. El ADN se aisló de los clones y se sometió a secuenciación de ADN de los genes V. Las secuencias se alinearon y se seleccionaron todos los clones únicos. Alineamientos múltiples de las secuencias obtenidas revelaron la exclusividad de cada clon particular y permitieron la identificación de anticuerpos únicos. Después del análisis de secuencias de 220 clones, se identificaron 70 grupos de secuencias de anticuerpos genéticamente distintos. Cada grupo de secuencias relacionadas probablemente había procedido de hipermutaciones somáticas de un clon precursor común. Generalmente, se seleccionó de uno a dos clones de cada grupo para la validación de secuencias y especificidad. Las secuencias de las secuencias variables del anticuerpo seleccionado se muestran en el Anexo 1. Las secuencias de nucleótidos incluyen sitios de restricción en ambos extremos. Por consiguiente, las secuencias de aminoácidos traducidas correspondientes (usando la tercera fase de lectura de la secuencia de ADN) incluyen en el extremo N dos aminoácidos que no forman parte de las secuencias VH y VL de acuerdo con la definición del IMGT (*International ImMunoGeneTics*) (Lefranc *et al* (2003) numeración única IMGT para los dominios variables del receptor de inmunoglobulina y células T y dominios similares a V de la superfamilia de Ig. Dev. Comp Immunol 27, 55-77). Todas las secuencias VL mostradas incluyen la misma región constante kappa humana, que comienza con los aminoácidos -TVAAP- y termina en el extremo C -NRGEC. Para los fines de la presente invención, la secuencia VL terminal, cuando se refiere a un anticuerpo específico, excluye la región constante kappa y los dos aminoácidos N terminales (LA-). La secuencia VH terminal, cuando se refiere a un anticuerpo específico, excluye los dos aminoácidos N terminales (RA-).

Validación de secuencias y especificidad

Para validar los clones que codifican el anticuerpo, se preparó ADN plasmídico y se realizó transfección de células CHO-S FreeStyle (Invitrogen) a una escala de 2 ml para su expresión. El sobrenadante se recogió 96 horas después de la transfección. Los niveles de expresión se estimaron con ELISA contra IgG convencional y la especificidad se determinó mediante ELISA específico de EGFR y de EGFRvIII. Se mostró que el 85 % de los clones tenían la especificidad y secuencia correctas.

Exploración de efectos antiproliferativos

El daño celular producirá inevitablemente una pérdida de la capacidad de la célula para mantener y proporcionar energía para crecer y realizar funciones celulares metabólicas. Los ensayos de actividad metabólica se basan en esta premisa. Normalmente miden la actividad mitocondrial. El reactivo de proliferación celular WST-1 (Roche Cat. n.º 11 644 807 001) es un sustrato listo para usar que mide la actividad metabólica de células viables. Se supone entonces que la actividad metabólica se correlaciona con el número de células viables. En este ejemplo se usó el ensayo con WST-1 para medir el número de células metabólicamente activas después del tratamiento con sobrenadantes de cultivo celular que contenían diferentes anticuerpos contra EGFR.

Antes de realizar el ensayo con WST-1 diferentes volúmenes de sobrenadantes de 2 ml (0, 10, 25, 50 y 150 µl) se transfirieron a pocillos apropiados en una placa de 96 pocillos.

Después, células HN5 se lavaron con PBS 1x y se desprendieron por tripsinización con solución de tripsina 3 ml. Después, se añadieron 17 ml de medio completo y las células se centrifugaron a 300xg (1200 rcf) durante 5 min. El sobrenadante se retiró y las células se resuspendieron en DMEM + FBS al 0,5 %. Las células se contaron y se ajustó su concentración y se añadieron 1500 células a los pocillos con sobrenadantes, de tal manera que cada pocillo contenía en total 200 µl de medio. Las placas se incubaron durante 4 días en una incubadora humidificada a una temperatura de 37 °C. Después, se añadieron 20 µl de reactivo WST-1 por pocillo y las placas se incubaron durante una hora a una temperatura de 37 °C. Después, las placas se transfirieron a un agitador de placa orbital y se dejaron otra hora. La absorbancia se midió a 450 y 620 nm (longitud de onda de referencia) en un lector ELISA. La diferencia en los niveles de células metabólicamente activas (MAC) se calculó como porcentaje de los sobrenadantes de control de la siguiente manera:

$$\% CMA = \left(1 - \frac{(DO \text{ exp.} - DO \text{ medios})}{(DO \text{ sin tratar} - DO \text{ medios})} \right) \times 100$$

Estos valores se usaron después como base para un análisis de agrupamiento (Cluster) jerárquico supervisado (agrupado en función de la reactividad en el ensayo ELISA) realizado usando el software Cluster y TreeView libre.

Es preferible poder explorar anticuerpos funcionales en una fase temprana en el proceso de selección de anticuerpos. Los sobrenadantes de cultivo de 83 transfecciones de 2 ml se usaron para explorar las funciones inhibitoras del crecimiento en un ensayo de proliferación realizado usando células HN5 en FBS al 0,5 %. Los resultados se visualizaron mediante análisis de agrupamiento jerárquico sencillo. Como puede observarse en el análisis de agrupamiento (Figura 5) se encontró un número de sobrenadantes que disminuía el número de células HN5 metabólicamente activas (gris oscuro) de una manera dependiente de la concentración (Grupo 2). De manera similar, algunos sobrenadantes aumentaron el número de células HN5 metabólicamente activas (gris claro) de una manera dependiente de la concentración (Grupos 1, 3 y 4). Una observación interesante fue que los sobrenadantes, que disminuían el número de células HN5 metabólicamente activas, tuvieron reactividad 2 (flechas negras) mientras que los sobrenadantes que aumentaban el número de células HN5 metabólicamente activas, tuvieron reactividad 1 (flechas grises). Los sobrenadantes con reactividad 2 fueron positivos tanto en el ELISA de wtEGFR (wt tipo silvestre, por *wild type*) como en el de EGFRvIII, mientras que los sobrenadantes con reactividad 1 solo tuvieron reactividad contra wtEGFR. Por tanto, dichos análisis pueden proporcionar relaciones entre la reactividad de anticuerpos en ensayos ELISA y la funcionalidad en ensayos celulares.

Reparación de clones

Cuando se usa una estrategia con PCR Multiplex, se espera un determinado grado de cebado en cruzado con la familia génica V intragénica e intergénica, debido a la degeneración de cebadores y al alto grado de homología. El cebado en cruzado introduce aminoácidos que no se producen de manera natural en el armazón de la inmunoglobulina, con posibles consecuencias diversas, por ejemplo, cambios estructurales y aumento de la inmunogenicidad, produciendo todo ello una actividad terapéutica disminuida.

Para eliminar estos inconvenientes y garantizar que los clones seleccionados reflejan la respuesta inmunitaria humoral natural, dichas mutaciones de cebado en cruzado se corrigieron en un proceso denominado reparación de clones.

En la primera etapa del procedimiento de reparación de clones, la secuencia V_H se amplificó por PCR con un conjunto de cebadores que contenía la secuencia correspondiente a la del clon de interés originado a partir del gen de V_H, corrigiendo de este modo cualquiera de las mutaciones introducidas por cebado en cruzado. El fragmento de PCR se sometió a digestión con *XhoI* y *AscI* y se ligó de nuevo en el vector de expresión de mamífero digerido con *XhoI/AscI* (Figura 4) usando procedimientos de ligamiento convencionales. El vector ligado se amplificó en *E. coli* y

el plásmido se purificó mediante métodos convencionales. La secuencia V_H se secuenció para verificar la corrección y el vector se sometió a digestión con *NheI/NotI* para prepararlo para la inserción de la cadena ligera.

5 En la segunda etapa, la cadena ligera completa se amplificó por PCR con un conjunto de cebadores que contenía la secuencia correspondiente a la del clon de interés originado a partir del gen de V_L, corrigiendo de este modo cualquiera de las mutaciones introducidas por cebado en cruzado. El fragmento PCR se sometió a digestión con *NheI/NotI* y se ligó en el vector que contenía V_H preparado anteriormente. El producto de ligamiento se amplificó en *E. coli* y el plásmido se purificó mediante métodos convencionales. Posteriormente, la cadena ligera se secuenció para verificar la corrección.

10 En el caso en el que la región constante Kappa de un clon seleccionado contenga mutaciones, introducidas durante la amplificación de los genes, esta se reemplaza por una región constante no mutada. Esto se realiza en una PCR solapante en la que el gen V_L reparado (amplificado sin la región constante) se fusionó con una región constante con secuencia corregida (obtenida en una PCR distinta). La secuencia entera se amplificó y se clonó en el vector que contenía V_H como se ha descrito anteriormente y en la cadena ligera reparada se secuenció para verificar la corrección.

Tabla 2 Programas de inmunización usados para generar material de partida para la clonación contra EGFR

Programa, Grupo de ratones	Cepa	Inyección 1	Inyección 2	Inyección 3	Inyección 4	Finalización
101	Balb/c	Día 1, 25 µg de rhEGFR (R&D systems 1095-ER) CFA s.c.	Día 35, 25 µg de rhGH-EGFR (Symphogen) IFA s.c	Día 56, 25 µg de rhEGFR* (Symphogen) IFA s.c	Día 70, 25 µg de rhEGFR* (Symphogen) IFA s.c	Día 73
108	Balb/c	Día 1, 1x10 ⁷ células HN5 CFA i.p.	Día 28, 25 µg de rhEGFR* (Symphogen) IFA s.c.	Día 42, 1x10 ⁷ células HN5 IFA i.p.	Día 56, 25 µg de rhEGFR*, (Symphogen) IFA s.c.	Día 59
109	Balb/c	Día 1, 1x10 ⁷ células HN5, CFA i.p.	Día 28, 25 µg de rhEGFR* (Symphogen) IFA s.c.	Día 42, 1x10 ⁷ células HN5 IFA i.p.	Día 56, 25 µg de rhEGFR* (Symphogen) PBS i.v.	Día 59
111	Balb/c	Día 1, 25 µg de rhEGFR* (Symphogen) CFA s.c.	Día 28, 25 µg de rhEGFR+ rhEGFRvIII** (Symphogen) IFA s.c.	Día 42, 25 µg de rhEGFR+ rhEGFRvIII** (Symphogen) IFA s.c.	Día 56, 25 µg de rhEGFR+ rhEGFRvIII** (Symphogen) IFA s.c.	Día 59
118	Balb/c	Día 1, 1x10 ⁷ células HN5 CFA i.p.	Día 29, 100 µg de rhGH-EGFR (Symphogen) IFA s.c.	Día 44, 1x10 ⁷ células HN5 IFA i.p.	Día 58, 25 µg de rhEGFR, (Sigma E3641) IFA s.c.	Día 61
119	C57B	Día 1, 1x10 ⁷ células HN5 CFA i.p.	Día 29, 100 µg de rhGH-EGFR (Symphogen) IFA s.c.	Día 44, 1x10 ⁷ células HN5 IFA i.p.	Día 58, 25 µg de rhEGFR, (Sigma E3641) IFA s.c.	Día 61

20

Tabla 3 Mezcla de cebadores de extensión para RT-PCR de solapamiento Multiplex

Nombre del cebador	Conc. (nM)	Secuencia	SEQ ID
mHCre	0,2	GACSGATGGGCCCTTGGTGG	1
mKapp	0,2	GCTGTAGGTGCTGTCTTTGC	2

mVH			
mVH A	0,04	TATTCCCATGGCGCGCCSAGGTCCARCTGCARCAGYCTG	3
mVH B	0,04	TATTCCCATGGCGCGCCGARGTGMAGCTKGTGAGTC	4
mVH C	0,04	TATTCCCATGGCGCGCCSAGGTGCAGCTKMAGGAGTC	5
mVH 8	0,04	TATTCCCATGGCGCGCCCAGGTTACTCTGAAAGAGTC	6
mVH 9	0,04	TATTCCCATGGCGCGCCCAGATCCAGTTGGTGCAGTCTG	7
mVK			
mVK D	0,04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCGAYATCCAGATGACHCARWCT	8
mVK E	0,04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCRACATTGTGMTGACHCAGTC	9
mVK F	0,04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCSAMATTGKCTSACCCARTCTC	10
mVK 1-	0,04	GGCGCGCCATGGGAATAGCTAGCCGATRTTGTGATGACBCARRCT	11
<i>W=A/T, R=A/G, S=G/C, Y=C/T, K=G/T, M=A/C, H=ACT, B=GCT; Conc. - concentración final.</i>			

Tabla 4 Conjunto de cebadores anidados

Nombre del cebador	Conc. (nM)	Secuencia	SEQ ID
mHCrev	0,2	GGACAGGGMTCCAKAGTTCCADKT	16
hmJK			
hmJK1-	0,2	GACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGATTTCCAGCTTGGTG	17
hmJK2-	0,2	GACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTTATTTCCAGCTTGGTC	18
hmJK4-	0,2	GACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTTATTTCCAACCTTTGTC	19
hmJK5-	0,2	GACAGATGGTGCAGCCACAGTTCGTTTCAGCTCCAGCTTGGTC	20
<i>K=G/T, M=A/C, D=AGT; Conc. - concentración final.</i>			

5

Tabla 5 Conjunto de cebadores de corte y empalme de la cadena kappa constante

Cebador	Conc. (nM)	Secuencia	SEQ ID
Amplificación de la cadena constante kappa humana			
hKCforw-v2	0,2	GAAGTGTGGCTGCACCATCTGTG	21
Kappa3'	0,2	ACCGCCTCCACCGGCGCCGCTTATTAACACTCTCCCCTGTTG	22
Corte y empalme por extensión solapante			
mhKCrev	0,2	ACCGCCTCCACCGGCGCCGCTTATTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTT	23
conjunto mJH			
mJH1	0,2	GGAGGCGCTCGAGACGGTGACCGTGGTCCC	12

mJH2	0,2	GGAGGCGCTCGAGACTGTGAGAGTGGTGCC	13
mJH3	0,2	GGAGGCGCTCGAGACAGTGACCAGAGTCCC	14
mJH4	0,2	GGAGGCGCTCGAGACGGTGACTGAGGTTCC	15

Ejemplo 2 Producción de anticuerpos contra EGFR de mamífero

5 Para la expresión transitoria de anticuerpos contra EGFR se usó el sistema de expresión CHO MAX FreeStyle (Invitrogen). Los anticuerpos se expresaron en un volumen de 200-2000 ml.

10 Aproximadamente, 24 horas antes de la transfección, se realizaron pases de células CHO-S hasta alcanzar una concentración de células de $0,5 \times 10^6$ células/ml. El plásmido (1,25 µg por ml de medio de cultivo celular) se diluyó en medio asérico OptiPro y se mezcló con una solución de reactivo de transfección MAX FreeStyle, como recomienda el fabricante. Los reactivos de transfección se transfirieron al cultivo celular y el sobrenadante se recogió 6 días después.

15 Los anticuerpos expresados se purificaron del sobrenadante de cultivo usando una etapa de cromatografía de afinidad que empleaba una columna de proteína A-Sepharose (MabSelect Sure, GE Health Care) para la purificación de las moléculas de IgG1. Los anticuerpos se eluyeron de la columna usando glicina 0,1 M, 2,7. Las fracciones que contenían anticuerpos, determinado por mediciones de absorbancia a 280 nm, se agruparon y dializaron frente a acetato sódico 5 mM, NaCl 150 mM, a un pH de 5. Las muestras de los anticuerpos purificados se ensayaron con respecto a la presencia de endotoxina utilizando el ensayo LAL.

20 Ejemplo 3 Determinación de las especificidades de los epítomos

ELISA de competición con anticuerpos de referencia

25 Usando anticuerpos de referencia que se unen a dominios de EGFR conocidos, como los publicados en J. R. Cochran *et al.*, JIM 2004: 287; 147-158, se desarrolló un ELISA de competición que podía diferenciar entre los epítomos de unión de los anticuerpos contra EGFR por incubación con un reactivo secundario que era específico para la región Fc humana de los anticuerpos contra EGFR y que no mostraban reactividad cruzada con la región Fc de IgG de ratón o rata. El ELISA se adaptó de las descripciones publicadas en Ditzel *et al*, 1995, The Journal of Immunology, Vol 154, publicación 2 893-906.

30 Se realizó un ELISA de bloqueo de epítomo diluyendo antígeno de receptor EGFR de longitud completa a 0,5 µg/ml en PBS; y recubriendo con 50 µl/pocillos del ELISA durante una noche a 4 °C. A la mañana siguiente los pocillos se lavaron dos veces con PBS-T y se bloquearon durante una hora con PBS-T-BSA al 1% a temperatura ambiente seguido de un lavado doble en PBS-T. Después, se añadieron 25 µl de los mAb de referencia murinos o de rata a pocillos ELISA independientes en una dilución conocida de experimentos previos para dar una unión antigénica máxima de 200 veces. Después de 15 min, se añadieron anticuerpos contra EGFR 25 µl en una concentración de 2 µg/ml a pocillos previamente incubados con anticuerpos de referencia o a pocillos que contenían PBS 25 µl. Esto produjo una concentración final de 1 µg/ml de anticuerpo contra EGFR y una unión antigénica máxima de 100 veces de los anticuerpos de referencia después de la mezcla. Los anticuerpos se incubaron durante 45 min a temperatura ambiente, después de lo cual, los pocillos se lavaron cuatro veces con PBS-T. Un anticuerpo secundario de cabra contra IgG humana conjugado con HRP se diluyó a 1: 3000, y se añadieron 50 µl a cada pocillo seguido de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente los pocillos se lavaron cuatro veces con PBS-T y las placas se revelaron añadiendo TMB 50 µl/pocillo y cada 5-15-30 minutos se efectuó la lectura a 620 nm. Se calculó el grado de inhibición a partir de la fórmula: % de inhibición = $(1 - (\text{DO de competición}/\text{DO sin competición (PBS)})) \times 100$.

Reactivos para el ensayo ELISA:

- 1) Tampón de recubrimiento: 1 x PBS; Gibco cat: 20012-019
- 2) antígenos: EGFR de longitud completa de tipo silvestre purificado de células A431; Sigma E3641
- 3) placa ELISA: NUNC Maxisorp; cat: 442404
- 4) Tampón de bloqueo/dilución: BSA al 1 % en PBS-T (PBS-T-BSA al 1 %)
- 5) Tampón de lavado: 1x PBS/Tween 20 al 0,05 % (PBS-T)
- 6) Control positivo: Erbitux (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Alemania, Catálogo n.º: 018964; Cetuximab), Vectibix (Amgen Inc, One Amgen Center Drive, Thousand Oaks CA 91320-1799, EE. UU., Cat n.º 3241400; Panitumumab)
- 7) Anticuerpos de referencia:
 - ICR10 (rata), Abcam, Ab231
 - 199.12 (murino), Lab Vision Ab-11, MS-396-PABX
 - EGFR.1 (murino), Lab Vision Ab-3, MS-311-PABX
 - H11 (murino), Lab Vision Ab-5, MS-316-PABX
 - B1D8 (murino), Lab Vision Ab-16, MS-666-PABX

- 111.6 (murino), Lab Vision Ab-10, MS-378-PABX
 - 225 (murino), Lab Vision Ab-2, MS-269-PABX
 - 528 (murino), Lab Vision Ab-1, MS-268-PABX
- 8) Anticuerpo de cabra contra IgG humana conjugado con HRP; Serotec, Star 106P
 9) TMB Plus; KemEnTec, cat n.º 4390L
 10) H₂SO₄ 1 M

El resultado del ELISA de competición se muestra en la Figura 6. Se emplearon ensayos de competición ELISA para clasificar sobrenadantes de anticuerpos contra EGFR de acuerdo con la especificidad del dominio de los anticuerpos de referencia utilizados suscitados contra el dominio extracelular de EGFR. Se tomaron valores de inhibición de 50-100 % como una indicación de competición significativa entre pares de anticuerpos que se unían a epítomos solapantes o a epítomos muy próximos entre sí en el antígeno, mientras que los valores de inhibición por debajo del 50 % indicaban que los epítomos reconocidos por los pares de anticuerpo no estaban muy próximos entre sí dando como resultado un impedimento estérico disminuido. Se descubrió que los anticuerpos contra EGFR se unían a una variedad de epítomos de ECD de EGFR, que incluía los dominios I, II y III. Para algunos anticuerpos este análisis no pudo diferenciar si el mAb específico se dirigía contra el dominio I o el dominio II. Dichas especificidades se designaron como dominio I/II. Adicionalmente, algunos anticuerpos parecieron unirse a epítomos únicos, lo cual no pudo deducirse adicionalmente en el ELISA de competición empleado (por ejemplo, los clones 1229 y 1320, Figura 6). Es posible que algunos de estos anticuerpos se dirijan contra el dominio IV, por lo cual no tuvieron reactividades con anticuerpos de referencia. Cabe destacar que los anticuerpos de dominio III pudieron dividirse adicionalmente en cuatro subgrupos basándose en los diferentes patrones de competición obtenidos con los anticuerpos de referencia murinos ensayados contra este dominio. El grupo I estaba constituido solo por el mAb 992 que se descubrió que competía por la unión con los anticuerpos de referencia Ab1 y Ab2. El grupo II estaba constituido por los mAb 1024 y 1042, procedentes ambos de la misma reordenación de Ig y por consiguiente mostraron una homología de secuencia muy próxima a nivel de ADN y de aminoácidos. Se descubrió que estos dos anticuerpos solo competían por la unión con Ab2. El grupo III estaba constituido por los mAb 1030, 1208 y 1277 que competían por la unión con los anticuerpos de referencia Ab1, Ab5 y AB10. Finalmente el grupo IV estaba constituido por el mAb 1254, que competía por la unión con todos los anticuerpos de referencia de dominio III Ab1, Ab2, AB5 y AB10 utilizados.

Análisis de competición para distintos epítomos con anticuerpos de la misma especie o de referencia usando tecnología de resonancia de plasmón superficial

En un aparato Biacore 3000 que contenía cuatro células de flujo, se realizó análisis SPR (resonancia de plasmón superficial, por las siglas en inglés *Surface Plasmon Resonance*). Una microplaca Biacore CM5 se conjugó con 10.000 Unidades de resonancia (Ur) de anticuerpo policlonal contra His en las células de flujo 1 a 4 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Usando un caudal de 5 µl/min, se inyectaron 15 µl de ECD de EGFR con 6xHis a una concentración de 20 µg/ml y se capturaron en las cuatro células de flujo con las que se había conjugado el anticuerpo policlonal contra His. Inmediatamente después de la inyección del antígeno se estableció la unión máxima del mAb contra EGFR sin competición en cada célula de flujo durante un proceso de referencia. En resumen, se inyectaron 5 µl de anticuerpo a una concentración de 40 µg/ml sobre todas las células de flujo con el EGFR capturado seguido de separación del complejo anticuerpo/antígeno con un lavado ácido a pH bajo (tiempo de contacto de 10 segundos con glicina-HCl 10 mM, pH 2). Después de la determinación de la unión máxima del anticuerpo contra EGFR en cada célula de flujo, se realizó un proceso de competición durante el mismo ciclo Biacore. Las células de flujo se saturaron primero con el antígeno ECD de EGFR seguido por inyección de diferentes anticuerpos de referencia o anticuerpos contra EGFR en células de flujo distintas, usando las mismas condiciones de saturación del antígeno como se ha indicado anteriormente. Después de esta etapa se realizó inmediatamente una segunda inyección de anticuerpo contra EGFR sobre la célula de flujo saturada con el antígeno EGFR y anticuerpo de competición para minimizar la disociación del antígeno o el bloqueo del anticuerpo. Después, los complejos anticuerpo/antígeno se separaron con un lavado ácido a pH bajo (tiempo de contacto de 10 s con glicina-HCl 10 mM, pH 2) y el ciclo completo que comenzaba con el proceso de referencia se repitió con un nuevo anticuerpo contra EGFR. El grado de inhibición de los anticuerpos contra EGFR ensayados se determinó comparando el valor máximo de Ur del anticuerpo contra EGFR individual antes y después de la competición introduciendo puntos revelados registrados dos segundos antes y después de la inyección de cada muestra. En la figura 7 se muestra un ejemplo de un ciclo Biacore.

Reactivos:

1. Microplaca CM5; Biacore, Cat. n.º BR-1000-14
2. NHS; Biacore BR-1000-50
3. EDC; Biacore BR-1000-50
4. Tampón acetato 10 mM, pH 4,5; Biacore, Cat. n.º BR-1003-50
5. Anticuerpo Tetra-His (sin BSA); Qiagen, Cat. n.º 34670
6. Etanolamina, 1,0 M pH 8,5; Biacore BR-1000-50
7. Tampón de desarrollo 10 x HBS-EP: HEPES 0,01 M pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Tensioactivo P20 0,005 % v/v

8. Antígeno: dominio extracelular de EGFR humano recombinante con 6 Histidinas, producido internamente.

9. Glicina-HCl 10 mM, pH 2,0

10. Anticuerpos de referencia:

• ICR10 (rata), Abcam, Ab231

5 • 199.12 (murino), Lab Vision Ab-11, MS-396-PABX

• EGFR.1 (murino), Lab Vision Ab-3, MS-311-PABX

• H11 (murino), Lab Vision Ab-5, MS-316-PABX

• B1D8 (murino), Lab Vision Ab-16, MS-666-PABX

• 111.6 (murino), Lab Vision Ab-10, MS-378-PABX

10 • 225 (murino), Lab Vision Ab-2, MS-269-PABX

• 528 (murino), Lab Vision Ab-1, MS-268-PABX

Para confirmar el análisis de epítomos obtenido en el ensayo ELISA de competición y realizar análisis de epítomos adicional mediante competición entre pares de anticuerpos contra EGFR de la misma especie, se estableció un ensayo de competición basado en la unión de anticuerpos medida en tiempo real por resonancia de plasmón superficial. El mapeo epitópico obtenido de clones contra EGFR ensayados contra el panel de anticuerpos de referencia se muestra más adelante en la figura 8. Valores de inhibición de 50-100 % se tomaron como una indicación de competición significativa entre pares de anticuerpos que se unían a epítomos solapantes o a epítomos muy próximos entre sí en el antígeno, mientras que valores de inhibición por debajo de 50 % indicaron que los epítomos reconocidos por los pares de anticuerpos no estaban muy próximos entre sí dando como resultado un impedimento estérico disminuido. Valores de inhibición por debajo de 25 % no se incluyeron en el análisis para epítomos solapantes, porque se consideró que representaban una inhibición no significativa. Se descubrió que, todos los anticuerpos ensayados, excepto el anticuerpo 1320, competían con uno o más de los anticuerpos de referencia empleados, lo que indicaba que el anticuerpo 1320 se dirigía contra un epítomo desconocido para el cual no había ninguna reactividad con anticuerpos de referencia. En el análisis se incluyeron los anticuerpos completamente humanos o humanizados Vectibix y Erbitux y se descubrió que se unían a epítomos solapantes. Los datos obtenidos tanto del ELISA competitivo como del análisis con resonancia de plasmón superficial, SPR, competitivo, se correlacionaban generalmente bien con respecto a la especificidad de dominio establecida de los anticuerpos contra EGFR. Sin embargo, algunas veces se observaron ligeras diferencias en el patrón de competición entre los anticuerpos de referencia individuales en los dos ensayos, quizá debido al hecho de que en el ensayo de competición ELISA se empleó antígeno del receptor EGFR de longitud completa mientras que en el ensayo de competición SPR se usó el dominio extracelular de EGFR recombinante.

Después de haber confirmado el mapeo epitópico de anticuerpos contra EGFR en dos ensayos de competición diferentes, se investigaron análisis de competición de combinaciones de pares de anticuerpos contra EGFR de la misma especie para resolver qué pares de anticuerpos eran reconocidos en diferentes epítomos y si pares de anticuerpos que reconocían epítomos solapantes podía dividirse adicionalmente en grupos de epítomos. El resultado de este análisis se muestra en la Figura 9. De nuevo en este análisis, los valores de inhibición de 50-100 % se tomaron como una indicación de competición significativa entre pares de anticuerpos que se unen a epítomos solapantes. Este criterio pareció válido, dado que los anticuerpos ensayados contra ellos mismos, y por consiguiente que reconocían epítomos solapantes completos, dieron como resultado valores de inhibición entre 70 % - 100 % como se muestra en la figura 9. Adicionalmente, esta observación ilustra que la disociación de cualquiera de los pares de antígenos o anticuerpos dentro del mismo periodo de tiempo del análisis no apareció tener un impacto sobre el resultado del experimento para los anticuerpos ensayados. Agrupando los anticuerpos de acuerdo con la supuesta especificidad del dominio ECD de EGFR en las secciones anteriores, se descubrió que los anticuerpos se unían exclusivamente al dominio I o a cualquiera de los dominios I o II (I/II) se agrupaban principalmente con miembros de anticuerpos con las mismas especificidades y no con miembros de anticuerpos que reconocían el dominio III. Del mismo modo, se descubrió que los anticuerpos de dominio III competían por la unión solo con miembros de anticuerpos que reconocían el dominio III y no con anticuerpos que reconocían el dominio I o I/II de EGFR. Cabe destacar que, aunque se encontró que los dos anticuerpos de dominio III, 1024 y 1042, procedentes del mismo reordenamiento de IgG, reconocían epítomos solapantes, no se encontró que las combinaciones por pares de cualquiera de 1024 o 1042 con cualquiera de 992 o 1030 dieran como resultado una competición significativa. Por consiguiente se llegó a la conclusión de que los anticuerpos 992, 1030 y 1024/1042 reconocían tres epítomos no solapantes en el dominio III del dominio extracelular de EGFR. Finalmente, se descubrió que el mAb 1320 competía por la unión con los mAb 1024 y 1449, ambos dirigidos contra el dominio III, y no con otros anticuerpos de dominio III ensayados (la competición de 1320 con 1042 no se determinó). Por consiguiente, se supuso que el mAb 1320 se unía en la periferia del dominio III en el dominio extracelular de EGFR. En la figura 10 puede observarse una revisión de las especificidades de los epítomos, ilustrándose en dicha figura mapas epitópicos de los anticuerpos dirigidos contra el dominio I, I/II o III del ECD de EGFR.

Después del descubrimiento de que las combinaciones por pares de 992, 1030 y 1024/1042 no daban como resultado una competición de anticuerpos significativa, determinada por RSP, se diseñaron nuevos experimentos Biacore para examinar cuántos anticuerpos podían unirse simultáneamente con el antígeno receptor. En primer lugar se investigó el impacto que tenía la saturación del Dominio III con los tres anticuerpos 992, 1024 y 1030 sobre la unión de anticuerpos dirigidos contra otras especificidades de EGFR que no fueran el dominio III. El resultado de este análisis se muestra en la Figura 11A. Las inhibiciones de anticuerpos sencillos se establecieron ensayándolos

en combinaciones con un solo anticuerpo o con mezclas de anticuerpos de hasta tres anticuerpos generados por adición secuencial de un anticuerpo extra durante cada ciclo Biacore. Para garantizar el bloqueo completo del epítipo reconocido, los anticuerpos se ensayaron en concentraciones individuales de 40 µg/ml. Como se muestra en la figura 11A, se descubrió que los tres anticuerpos 992, 1024 y 1030 de dominio III se unían simultáneamente al receptor sin ninguna inhibición de unión. Los valores de inhibición negativos observados que aumentaban por cada anticuerpo añadido sugirieron adicionalmente una sinergia en la unión para el siguiente anticuerpo añadido. Cabe destacar que, una vez que el dominio III se incubó con los tres anticuerpos, otros anticuerpos dirigidos contra epítipos no solapantes en el dominio I/II (mAb 1261), dominio I (1347) o uno de especificidad desconocida (1361) parecía que se unían sin bloqueo epitópico de la mezcla de los tres mAb. Adicionalmente, estos anticuerpos ensayados tuvieron pequeños valores de inhibición negativa lo que indicaba que se unían mejor después de la saturación del receptor con la mezcla de los tres mAb. Por consiguiente, este experimento sugirió que los seis anticuerpos ensayados podían unirse al ECD de EGFR simultáneamente. Para ensayar adicionalmente este fenómeno observado, se hizo una mezcla de anticuerpos que consistía en todos los anticuerpos ensayados (1261, 1347, 992, 1024, 1030 y 1361) y se ensayó con respecto a la inhibición de cada anticuerpo de muestra individual en la mezcla. Las mezclas de anticuerpo en las que no se incluyó el anticuerpo de muestra ensayado también se ensayaron para servir como un control positivo. Como se representa en la Figura 11B/C, se descubrió que los seis anticuerpos ensayados inhibían del 80 - 116 % cuando se ensayaban con respecto a la unión con el receptor de EGF incubado con la mezcla completa de los anticuerpos. Sin embargo, cuando los anticuerpos de la muestra individual se retiraron de esta mezcla, no se apreció inhibición significativa del anticuerpo de muestra particular, lo que ilustra que los anticuerpos en la mezcla solo estaban bloqueados, por sí mismos, para la unión con el receptor de EGF. Este experimento ilustra claramente que al menos seis anticuerpos que reconocen epítipos no solapantes pueden unirse a EGFR de manera simultánea. Como un experimento final se investigó si otros anticuerpos dirigidos contra el dominio I (1284), I/II (1257) o contra un grupo de especificidad desconocida (1183, 1255) podían unirse al EGFR, cuando este se incubaba con la mezcla de los seis anticuerpos. Como se presenta en la Figura 11D ninguno de los anticuerpos ensayados pudo unirse significativamente a EGFR después de una incubación previa con la mezcla de seis anticuerpos. Esto puede deberse a que la colección de anticuerpos no incluye anticuerpos contra ninguno de los sitios dejados sin ocupar por los seis anticuerpos unidos. Como alternativa, es posible que, de hecho, todos los sitios en los dominios ensayados estuviesen bloqueados con anticuerpos.

Tabla 6 Anticuerpos disponibles en el comercio con especificidades documentadas contra dominios extracelulares de EGFR.

Clon	Especie	Dominio I	Dominio II	Dominio III
ICR10	Rata	X		
199.12/Ab11	Ratón	X		
EGFR.1/Ab3	Ratón		X	
H11/Ab5	Ratón			X
111.6/Ab10	Ratón			X
528/Ab-1	Ratón			X
225/Ab-2	Ratón			X

Ejemplo 4 Inhibición de la activación de EGFR

Determinación, mediante ELISA competitivo, del bloqueo de la unión del ligando EGF con el receptor EGFR mediado por anticuerpos

Para verificar que los anticuerpos contra EGFR ensayados se unían con el receptor EGFR y bloqueaban simultáneamente la unión del ligando EGF biotinilado, pocillos ELISA se revistieron con 80 µl/pocillo de EGFR de longitud completa en una concentración de 0,5 µg/ml en PBS durante una noche a 4 °C. A la mañana siguiente los pocillos se lavaron dos veces con PBS-T y se bloquearon durante una hora con 150 µl de PBS-T-BSA al 1 % a temperatura ambiente, seguido de un lavado doble en PBS-T. Después, a los pocillos se añadieron 80 µl de anticuerpos contra EGFR diluidos en serie y anticuerpos de control y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Después de la incubación de los anticuerpos, se añadieron 20 µl de ligando EGF biotinilado a una concentración de 0,5 µg/ml a todos los pocillos que contenían diluciones de anticuerpos contra EGFR o a los pocillos que contenían solo PBS-T BSA al 1 % y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente los pocillos se lavaron cinco veces con PBS-T, seguido de incubación con 100 µl/pocillo de reactivo secundario estreptavidina-HRP diluido a 1:1000 en tampón de bloqueo e incubación a temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente los pocillos se lavaron cinco veces con PBS-T y las placas se revelaron añadiendo sustrato TMB 100 µl/pocillo y se incubaron durante 60 min. Después de la incubación la reacción se detuvo por adición de 100 µl/pocillo de H₂SO₄ 1 M y las placas se leyeron a una DO de 450 nm.

Reactivos ELISA:

- 1) Tampón de recubrimiento: 1 x PBS; Gibco cat: 20012-019
 - 2) Antígeno: EGFR de longitud completa de tipo silvestre purificado de células A431; Sigma E2645
 - 5 3) Placa ELISA: Maxisorp NUNC; cat: 442404
 - 4) Tampón de bloqueo/dilución: BSA al 1 % en PBS-T (PBS-T-BSA al 1 %)
 - 5) Tampón de lavado: 1x PBS/Tween 20 al 0,05 % (PBS-T)
 - 6) Control positivo: Erbitux, Vectibix
 - 7) Control negativo: Synagis (Medimmune Inc, Palivizumab, cat. n.º NDC 60574-4111-1).
 - 10 8) Ligando EGF biotinilado; Invitrogen, cat. E3477
 - 9) Estreptavidina-HRP, ultra sensible: Sigma S 2438
 - 10) TMB Plus; KemEnTec, cat. n.º 4390L
 - 11) H₂SO₄ 1 M
- 15 Se emplearon ensayos de competición ELISA para clasificar la capacidad de los anticuerpos contra EGFR para inhibir la unión del ligando EGF biotinilado con el receptor EGFR de longitud completa aplicado a pocillos ELISA. Como se presenta en la figura 12, tanto Erbitux como Vectibix parecieron ser muy fuertes bloqueando la unión del ligando EGF mientras que el anticuerpo de control negativo Synagis, que no se dirige contra EGFR, no inhibió la unión del ligando EGF. Como se muestra en la figura 12A, los tres anticuerpos 992, 1030 y 1042 dirigidos contra el
- 20 dominio III y que reconocían epítomos no solapantes, se ensayaron en solitario o en una mezcla equimolar para determinar su capacidad para inhibir la unión al ligando EGF. De los tres anticuerpos ensayados solo el mAb 1030 mostró una actividad de inhibición del ligando EGF moderada cuando se comparó con Erbitux y Vectibix. La mezcla equimolar de los mAb 992, 1030 y 1042 pareció ser más eficaz inhibiendo la unión del ligando EGF en comparación con los anticuerpos sencillos ensayados en solitario. A una concentración de IgG total de 1 µg/ml, se descubrió que
- 25 la mezcla equimolar inhibía la unión del ligando EGF aproximadamente dos veces de un modo más eficaz que el mAb 1030 y cuatro veces de un modo más eficaz que los mAb 992 y 1042 ensayados en solitario, lo que muestra un efecto sinérgico de mezclar tres anticuerpos de dominio III que reconocen epítomos no solapantes. Como se muestra en la figura 12B, los clones 1208, 1260, 1277 y 1320 contra EGFR, también se analizaron en este ensayo. Estos cuatro clones pudieron inhibir la unión del ligando EGF de una manera dependiente de la dosis que fue más eficaz
- 30 que lo observado para los clones 992, 1030 y 1042 cuando se comparó con el control Erbitux. A concentraciones superiores a 0,33 µg/ml los clones 1208, 1260, 1277 y 1320 contra EGFR parecieron ser tan eficaces bloqueando la unión del ligando EGF como Erbitux ensayado a las mismas concentraciones.

Capacidad para inhibir la fosforilación de EGFR inducida por EGF en células HN5

- 35 Los anticuerpos contra EGFR se ensayaron con respecto a la reactividad sobre la fosforilación de EGFR en un análisis western celular. El procedimiento western celular permite la detección de EGFR y de EGFR fosforilado (pEGFR) a partir de la misma muestra, que a su vez posibilita comparar la proporción de la expresión de EGFR con respecto a pEGFR para cada tratamiento con anticuerpo y conjunto de datos. Se cultivaron células HN5 de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por la ATCC en DMEM complementado con FCS al 10 % y pen./estrep. Se sembraron 43.000 células HN5 en placas de 96 pocillos de Nunc (cat. n.º 167008) 24 h antes de la inanición. Las células se privaron en DMEM 16 h antes de la adición de los anticuerpos. Los anticuerpos se añadieron a una concentración final de 10 µg/ml en DMEM 200 µl y la mezcla se pipeteó hacia arriba y hacia abajo al menos cinco veces para mezclarla. Después de 30 min de tratamiento con anticuerpo se añadió EGF a una concentración de 50
- 45 µg/ml a los pocillos apropiados y se dejaron durante 7,5 min. Los western celulares se realizaron esencialmente siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante del kit western celular (Odyssey, LI-COR biosciences).

- Las células se fijaron en formaldehído al 3,7 % (Sigma F-8775, lote 71K500 que contenía ~ metanol al 1 %) durante 20 min después de estimulación con EGF. Se realizaron cinco lavados de 5 min con PBS-Triton X-100 (0,1 %) para permeabilizar las membranas celulares antes de bloquear en el tampón de bloqueo LI-COR (927-40.000). Se añadieron anticuerpos primarios a concentraciones correspondientes a las de las instrucciones proporcionadas y se incubaron con agitación suave a TA durante 2,5 h (EGFR total de ratón, dilución 1:500 biosource International, cat. n.º AHR5062 y fosfo-EGFR Tyr1173, conejo dilución 1:100, biosource, cat. n.º 44-794G).

- 55 Después de incubación con los anticuerpos primarios las células se lavaron cinco veces durante cinco minutos en PBS-T (tween-20 al 0,1 %) después de lo cual se añadieron anticuerpos secundarios (cabra- anti-conejo IRDye 680, dilución 1:200, LI-COR cat. n.º 926-32221 y cabra-anti- ratón, IRDye 800 CW dilución 1:800; LI-COR cat. n.º 926-32210) y se incubaron durante 1 h a TA con agitación suave de la placa cubierta con papel de aluminio.

- 60 Antes de la medición en el lector de fluorescencia Tecan, la placa se lavó cinco veces durante cinco minutos en PBS-T. Todos los lavados terminaron mediante un movimiento de lanzamiento abruptamente abortado de las placas, lado abierto hacia abajo, para disipar la solución de lavado, seguido de golpeteo de la placa contra toallitas de papel. (Idéntico al tratamiento de placas ELISA, la cuestión importante es la idea de que las células permanecen en la placa durante este tratamiento y que la solución de lavado puede retirarse mediante este procedimiento en lugar de por succión, lo que alteraría la integridad de la monocapa celular). Cualquier solución de lavado residual dejada desde el último lavado se retiró por succión suave en el lado de los pocillos con una pipeta multicanal. La señal

fluorescente se midió para el canal de 680 nm (excitación 675 nm y emisión 705 nm, ambas con una anchura de banda de 10 nm) y para el canal de 800 nm (excitación de 762 nm y emisión de 798 nm; ambos con una anchura de banda de 10 nm).

- 5 Usando el análisis western celular, resulta evidente que los tres anticuerpos afectan significativamente ($p < 0,05$) al estado pEGFR de células HN5; los anticuerpos 1208, 1277 y 1320 (Figura 13).

10 La mezcla contra EGFR (992, 1030 y 1042) de anticuerpos contra EGFR y los anticuerpos individuales en su interior, se ensayaron para determinar el efecto en un análisis Western celular de inhibición de la fosforilación de EGFR inducida por EGF. Como se observa en la Figura 14, la mezcla de los anticuerpos 992 y 1030 y contra EGFR inhibieron significativamente la fosforilación de EGFR inducida por EGF ($p < 0,05$).

Ejemplo 5 Internalización de receptores de EGF en células A431NS

15 Células A431NS (ATCC n.º CRL-2592) se trataron con tripsina a partir de un matraz de cultivo T175 de confluencia 80-90 % usando TrypLE. Las células liberadas se lavaron en PBS y se suspendieron en DMEM sin suero. Las células se dividieron en partes de 1-2 ml y se incubaron durante 30 minutos en hielo con los anticuerpos examinados. La concentración de anticuerpo era de 10 $\mu\text{g/ml}$. Las células se lavaron tres veces en DMEM (250 g, 4 min, 4 °C) y se resuspendieron en DMEM 1,8 ml. Cada parte se dividió en seis tubos FACS conteniendo cada uno de ellos suspensión celular 300 μl . Tres tubos de cada parte se colocaron en un baño de agua a 37 °C exactamente durante 40 min y los otros tres se pusieron inmediatamente en hielo. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces (250 g, 4 min, 4 °C) y los sedimentos se redisolviaron en anticuerpo contra IgG Fc γ F(ab')₂ humano de conejo conjugado con FITC 100 μl en DMEM. Las células se incubaron durante 30 min a 4 °C antes de lavar tres veces en DMEM a 4 °C y se analizaron en un FACSCalibur.

25 En la Figura 15 se muestran los resultados. La incubación con Erbitux y Vectibix mostró un nivel de internalización equivalente de receptor de aproximadamente 30 % dejando un 70 % de tinción de superficie inicial. La incubación solo con 992 conduce a una regulación negativa del receptor de alrededor del 70%. La incubación con mezclas de anticuerpos que contienen dos anticuerpos adicionales con epítopos no solapantes conduce a un aumento en la regulación negativa del receptor: 992 + 1024, 74 %; 992 + 1024 + 1030, 83 %.

30 La adición de más anticuerpos no condujo a aumentar más la internalización en el receptor. Por tanto, pareció que se necesitaban al menos tres anticuerpos para conseguir el nivel de internalización máximo en células A431.

35 Ejemplo 6 - Ensayos de proliferación

El daño celular producirá inevitablemente una pérdida de la capacidad de la célula para mantener y proporcionar energía para crecer y realizar funciones celulares metabólicas. Los ensayos de actividad metabólica se basan en esta premisa. Normalmente miden la actividad mitocondrial. El reactivo de proliferación celular WST-1 (Roche Cat. n.º 11 644 807 001) es un sustrato listo para usar que mide la actividad metabólica de células viables. Se supone entonces que la actividad metabólica se correlaciona con el número de células viables. En este ejemplo se usó el ensayo con WST-1 para medir el número de células metabólicamente activas después del tratamiento con diferentes anticuerpos en diferentes concentraciones.

45 Antes de realizar el ensayo con WST-1 los anticuerpos apropiados y las mezclas de anticuerpos se diluyeron a una concentración de anticuerpos total final de 20 $\mu\text{g/ml}$ en DMEM complementado con 0,5 % de FBS y 1 % de P/S produciendo una concentración de anticuerpo final de 10 $\mu\text{g/ml}$ en el pocillo con la concentración de anticuerpo más alta. Después, 150 μl de estas soluciones se añadieron a pocillos en la columna 2 de una placa de 96 pocillos y se realizó una dilución en serie de factor tres en la columna 9 de manera que cada pocillo contenía 100 μl de solución de anticuerpo. Se añadieron 100 μl de medios a la columna 11. Se añadieron 200 μl de medios a las filas 1 y 8 así como a la columna 1 y 12 para disminuir el efecto de la evaporación de los medios en los pocillos experimentales.

50 Después las células A431-NS se lavaron con PBS 1x y se liberaron con tripsina con una solución de tripsina de 3 ml. Después se añadieron 17 ml de medio completo y las células se centrifugaron a 300xg (1200 rcf) durante 5 min. El sobrenadante se retiró y las células se resuspendieron en DMEM + FBS al 0,5 %. Las células se contaron y su concentración se ajustó a 15.000 células/ml. Después, se añadieron 100 μl de la suspensión celular (1500 células/pocillo) a pocillos experimentales en las columnas 2-11. Las placas se incubaron durante 4 días en una incubadora humidificada a 37 °C. Después, se añadieron 20 μl de reactivo WST-1 por pocillo y las placas se incubaron durante una hora a 37 °C. Después, las placas se transfirieron a un agitador de placa orbital y se dejaron durante otra hora. La absorbancia se midió a 450 y 620 nm (longitud de onda de referencia) en un lector ELISA. La cantidad de células metabólicamente activas (CMA) se calculó como porcentaje del control no tratado de la siguiente manera:

$$\% CMA = \left(1 - \frac{(DO \text{ exp.} - DO \text{ medios})}{(DO \text{ sin tratar} - DO \text{ medios})} \right) \times 100$$

Para los estudios de titulación de EGF, el ligando se diluyó a una concentración de 20 nM/ml en DMEM+FBS al 0,5 %, produciendo una concentración final de 10 nM/ml en el pocillo con la concentración de EGF más alta. Después, se añadieron 150 µl de esta solución a los pocillos en la columna 2 de una placa de 96 pocillos y se realizó una dilución en serie con factor tres en la columna 9 de tal manera que cada pocillo contenía 100 µl de solución EGF. Se añadieron 100 µl de medios a la columna 11. Se añadieron 200 µl de medios a las filas 1 y 8 así como a la columna 1 y 12 para disminuir el efecto de la evaporación de los medios en los pocillos experimentales. Los anticuerpos apropiados y las mezclas de anticuerpos se diluyeron a una concentración de anticuerpo total final de 40 µg/ml en DMEM complementado con 0,5 % de FBS y P/S al 1 % produciendo una concentración final de anticuerpo de 10 µg/ml en los pocillos. Después, 50 µl de estas soluciones se añadieron a los pocillos en las columnas 2-9 de la placa de 96 pocillos.

Después, las células A431-NS se lavaron con PBS 1x y se liberaron con tripsina con una solución de tripsina de 3 ml. Después, se añadieron 17 ml de medio completo y las células se centrifugaron a 300xg (1200 rcf) durante 5 min. El sobrenadante se retiró y las células se resuspendieron en DMEM + FBS al 0,5 %. Las células se contaron y su concentración se ajustó a 40.000 células/ml. Después, se añadieron 50 µl de la suspensión celular (2000 células/pocillo) a pocillos experimentales en las columnas 2-11. Las placas se incubaron durante 4 días en una incubadora humidificada a 37 °C. Después, se añadieron 20 µl de reactivo WST-1 por pocillo y las placas se incubaron durante una hora a 37 °C. Después, las placas se transfirieron a un agitador de placa orbital y se dejaron una hora más. La absorbancia se midió a 450 y 620 nm (longitud de onda de referencia) en un lector ELISA. La cantidad de células metabólicamente activas se indican por la absorbancia a 450 nm menos la absorbancia a la longitud de onda de referencia de 620 nm.

La cantidad de células metabólicamente activas (CMA) se calculó como porcentaje del control no tratado de la siguiente manera:

$$\% CMA = \left(1 - \frac{(DO \text{ exp.} - DO \text{ medios})}{(DO \text{ sin tratar} - DO \text{ medios})} \right) \times 100$$

Resultados

Para mostrar que una mezcla de los tres anticuerpos contra EGFR con epítomos no solapantes dentro del dominio III es superior a los anticuerpos en solitario, se realizó un experimento que investigó la inhibición del crecimiento de células A431-NS. Como puede observarse en la Figura 16A, los anticuerpos son, por sí mismos, malos inhibidores del crecimiento de células A431-NS, pero cuando se combinan se obtiene un efecto inhibitor sinérgico en el crecimiento de células 431-NS. Aunque las mezclas de 992 con cualquiera de 1042 o 1030 son también muy fuertes, la mezcla de los tres es superior a la de estos en todos los intervalos de concentración de anticuerpos.

Se investigaron los efectos de los anticuerpos individuales y de las mezclas de anticuerpos sobre el crecimiento de células A431-NS estimuladas con diversas concentraciones de EGF y los resultados se muestran en la Figura 17. Como puede observarse en la Figura 17, las concentraciones de EGF por encima de 0,1 nM en ausencia de anticuerpos son tóxicas para las células. Sin embargo está claro que una mezcla de tres anticuerpos con epítomos no solapantes dentro del dominio III de EGFR (992, 1030 y 1042) actúa sinérgicamente inhibiendo el crecimiento de células A431-NS en presencia de EGF cuando se ensayan hasta al menos 0,3 nM de EGF y la mezcla es superior a todos los anticuerpos monoclonales.

A continuación se demostró que el efecto inhibitor sinérgico sobre el crecimiento de células A431-NS también podía obtenerse combinando dos anticuerpos con epítomos no solapantes en el dominio III de EGFR con anticuerpos con epítomos dentro de cualquiera del dominio I o II de EGFR. Como puede observarse en la Figura 18, las combinaciones de los anticuerpos 992 y 1024, siendo ambos dominios III de EGFR, con cualquiera de un reactivo de anticuerpo con dominio I (1284) o con dominio I/II (1434) de EGFR son tan fuertes como los tres anticuerpos que reaccionan con epítomos no solapantes en el dominio III de EGFR (992 + 1024 + 1030). Además, estas mezclas de anticuerpos son más fuertes inhibiendo el crecimiento de células A431-NS que los anticuerpos terapéuticos contra EGFR, Erbitux y Vectibix.

Se realizaron ensayos similares usando dos líneas de células de cáncer distintas, DU145 (ATCC n.º HTB-81) y MDA-MB-468 (ATCC n.º HTB-132). Los resultados de estos ensayos de proliferación se muestran en las Figuras 16B y 16C. En ambos casos, una mezcla de tres anticuerpos (992, 1030 y 1042) fue superior a mezclas de dos

anticuerpos y de anticuerpos en solitario. En células DU145 la mezcla de tres anticuerpos fue superior a Vectibix a todas las concentraciones y en MDA-MB-468 a altas concentraciones.

5 Usando un método similar al descrito anteriormente se analizaron diferentes combinaciones de tres anticuerpos contra EGFR.

Resultados

10 Los efectos de diferentes combinaciones de tres anticuerpos se investigaron en la línea celular A431NS. La actividad inhibidora del crecimiento de las veinte más fuertes de estas, se muestran en la Figura 37. Todas las combinaciones inhibieron la proliferación de la línea celular A431NS más del 60 % en comparación con un control no tratado. Otra observación interesante es que con la excepción de las combinaciones (992+1024+1254 y 992+1024+1320 y 992+1277+1320) las combinaciones contienen anticuerpos con epítomos no solapantes. Esto muestra que es posible diseñar diversas combinaciones de tres anticuerpos que se unen a epítomos distintos.

15 Ejemplo 7 - Apoptosis.

20 La apoptosis es un mecanismo biológico que conduce a la muerte de la célula. Este mecanismo se ha descrito previamente mediante el uso de anticuerpos contra EGFR, tal como Erbitux (Baselga J. The EGFR as a target for anticancer therapy - focus on cetuximab. Eur J Cancer. Sep. 2001;37, Supl 4: S16-22). Por lo tanto se investigó hasta qué grado los anticuerpos individuales contra EGFR, 992, 1042 y 1030, así como la mezcla (992+1042+1030) podía inducir la apoptosis.

25 Se incubaron 1×10^4 células A431NS en DMEM complementado con FBS al 0,5 % y antibióticos en determinaciones triples en placas de cultivo de 96 pocillos en presencia de la mezcla de EGFR (partes iguales de 992, 1030, 1042), 992,1030, 1042, Erbitux o Vectibix, en concentraciones que variaban de 0,01 $\mu\text{g/ml}$ a 10 $\mu\text{g/ml}$. Las células y los anticuerpos se incubaron durante 22 h. Después, los sobrenadantes se recogieron y se midieron en un kit ELISA de Roche, Cat. n.º: 11774425001 (Basilea, Suiza) para determinar la presencia de complejos histona-ADN.

30 El efecto de la mezcla se comparó con cada uno de los anticuerpos monoclonales en solitario así como con los anticuerpos de referencia Vectibix y Erbitux, usando células A431 NS (resultados en la Figura 19). Los anticuerpos se ensayaron en una dilución de factor 10. La mezcla es significativamente ($p < 0,05$) más eficaz en comparación con los anticuerpos monoclonales individuales así como con Vectibix cuando se ensayan a concentraciones de 1 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$. La mezcla aumentó la apoptosis de un modo estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en comparación con Erbitux a 1 $\mu\text{g/ml}$.

35 Ejemplo 7b

40 Además de las mezclas indicadas en el ejemplo 7, para determinar la actividad apoptótica, se investigó la mezcla de 992+1024, así como la mezcla de 992+1024+1030, siguiendo el mismo método que el descrito en el ejemplo 7 (figura 35). El nivel real de apoptosis se relacionó con un control positivo máximo. Las dos mezclas se compararon con Erbitux y con los anticuerpos monoclonales individuales 992, 1024 y 1030, así como con un anticuerpo de control en 1 $\mu\text{g/ml}$, usando células A431 NS. La mezcla de 992+1024 fue significativamente mejor que Erbitux y que los anticuerpos monoclonales individuales (todo con un valor de $p < 0,05$).

45 Ejemplo 8 Eficacia *in vivo*

50 La mezcla de anticuerpos contra EGFR, que consistía en los anticuerpos 992, 1030 y 1042, se investigó para determinar la eficacia *in vivo* en el modelo de xenoinjerto de ratón desnudo usando células A431 NS. Este modelo se utiliza mucho para investigar la fuerza de los anticuerpos monoclonales contra el cáncer, incluyendo anticuerpos contra EGFR. Los ratones desnudos están inmunocomprometidos y carecen de células T. Esto permite el crecimiento de células humanas en los ratones.

55 Dos grupos de ratones desnudos de 6-8 semanas de vida recibieron inyecciones, por vía subcutánea, de 1×10^6 células A431NS. El tratamiento comenzó cuando el tamaño promedio del tumor alcanzó los 100 mm^3 . Los ratones recibieron cinco inyecciones de 1 mg de anticuerpo, por vía intraperitoneal, con un intervalo de 2-3 días. Los tamaños tumorales se midieron en dos diámetros usando calibradores digitales y el volumen se calculó usando la fórmula: volumen tumoral (mm^3) = $L \times W^2 \times 0,5$, en la que L es el diámetro más grande y W es el diámetro más pequeño (Teicher BA, Tumor Models in Cancer Research. Humana Press, NJ, EE. UU. 2002, p596). Al final del experimento, los tumores se extirparon y se pesaron.

60 Se usó Synagis como anticuerpo de control. El experimento también incluyó el tratamiento con Erbitux y Vectibix en la misma cantidad y utilizando el mismo programa que el utilizado para la mezcla de anticuerpos contra EGFR (anticuerpos 992, 1030 y 1024).

65

Como se observa en la figura 20, la mezcla de 992, 1030 y 1042, inhibió significativamente el crecimiento del tumor de las células A431 NS ($P < 0,05$). Los pesos promedio se muestran en la figura 21. El resultado se correlacionó con los tamaños de los tumores medidos. Hay una diferencia significativa entre el grupo de tratamiento y el grupo de control.

5

Ejemplo 8b Eficacia *in vivo*

Además del experimento *in vivo* descrito en el ejemplo 8, las mezclas de los anticuerpos 992+1024 y 992+1024+1030 se investigaron en el modelo de xenoinjerto utilizando células A431 NS descrito anteriormente (figura 36). Cuatro grupos, cada uno de 9 ratones desnudos de 6-8 semanas de vida, recibieron inyecciones por vía subcutánea de 1×10^6 células A431 NS. Cuando el tamaño promedio del tumor alcanzó los 100 mm^3 , los ratones recibieron la primera inyección de anticuerpos. Los tres grupos recibieron cualquiera de las mezclas de 992+1024+, 992+1024+1030, Erbitux o el anticuerpo de control, Synagis. En todos ellos, los ratones recibieron 17 inyecciones de 0,5 mg 4 veces por semana. La primera inyección se puso el día 8 y la última inyección el día 34. Los tamaños de los tumores se midieron durante 56 días. Después de finalizar el tratamiento con los anticuerpos, el tamaño de los tumores de los ratones que recibieron Erbitux comenzó a expandirse, mientras que los tumores continuaron disminuyendo en tamaño para los ratones en los dos grupos que recibieron la mezcla de cualquiera de 992+1024 o 992+1024+1030. No se observó expansión en el tamaño tumoral para el grupo tratado con 992+1024 el día 91 (57 días después de finalizar el tratamiento). El día 56, el tamaño promedio del tumor para la combinación de 992+1024 fue significativamente más pequeño ($P < 0,01$) en comparación con el tamaño promedio del tumor para los ratones que recibieron Erbitux.

En el experimento también se controló la supervivencia de los ratones. Los ratones se puntuaron como muertos cuando los tumores alcanzaron los tamaños máximos permitidos. La siguiente tabla muestra el número de ratones supervivientes 56 días después de la inoculación de las células tumorales. Se observa una supervivencia mejorada para las dos combinaciones en comparación con Erbitux.

25

Grupo	992+1024	992+1024+1030	Erbitux	Ab de control
Número inicial de ratones	9	9	9	9
Ratones supervivientes el día 56	9	9	2	0

Experimentos adicionales

30

Datos preliminares sobre lisados tumorales del experimento con xenoinjerto descrito en el ejemplo 8 muestran que la combinación de 992+1042+1030 induce una fuerte regulación negativa de la producción de VEGF por células A431 NS, siendo el primero un mediador importante de la angiogénesis. La formación aumentada de vasos sanguíneos es un fenómeno que se observa en muchos tumores sólidos, un mecanismo que participa en el aporte prolongado de nutrientes, etc., afectando por lo tanto a las condiciones de supervivencia.

35

Además, otros datos preliminares muestran que puede observarse un nivel aumentado de la combinación de anticuerpos 992+1042+1030 en los lisados tumorales del experimento con xenoinjerto descrito en el ejemplo 8, cuando se compara con Erbitux y Vectibix.

40

Ejemplo 8c. Diferenciación potenciada de células tumorales *in vivo*

La diferenciación terminal de las células es un proceso complejo que incluye la activación de programas de expresión de genes específicos de tipos de células, que conduce, en un proceso multietapa, a una pérdida irreversible de su capacidad proliferativa. En enfermedades neoplásicas, las células cancerosas están, a menudo, en un estado desdiferenciado caracterizado por una velocidad de proliferación aumentada, y se ha sugerido que los fármacos que pueden inducir la diferenciación terminal de las células cancerosas podrían eliminar las células malignas y reestablecer la homeostasis celular normal (Pierce GB, Speers WC: Tumors as caricatures of the process of tissue renewal: prospects for therapy by directing differentiation. *Cancer Res* 48: 1996-2004, 1988). En determinadas condiciones experimentales, se ha indicado previamente que los anticuerpos monoclonales contra EGFR pueden aumentar la velocidad de diferenciación terminal de células cancerosas escamosas humanas que crecen como tumores de xenoinjerto en ratones inmunocomprometidos (Milas L, Mason K, Hunter N, Petersen S, Yamakawa M, Ang K, Mendelsohn J, Fan Z: In vivo enhancement of tumor radioresponse by C225 anti-epidermal growth factor receptor antibody. *Clin Cancer Res* 6: 701-8, 2000; Modjtahedi H, Eccles S, Sandle J, Box G, Tittley J, Dean C: Differentiation or immune destruction: two pathways for therapy of squamous cell carcinomas with antibodies to the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 54: 1695-701, 1994).

45

50

Se examinó histológicamente el grado de diferenciación terminal en células A431 NS tratadas con anticuerpos contra EGFR cultivados como xenoinjertos en ratones. El estudio histológico incluyó 3 tumores de xenoinjerto de ratón seleccionados al azar de cada uno de los cuatro grupos experimentales del experimento descrito en el ejemplo 8.

55

60

5 Los tejidos se diseccionaron y se congelaron instantáneamente, después se montaron con Tissue-Tek en un criomicrotomo (Leitz, modelo 1720), se cortaron en secciones de 5 µm y se tomaron muestras en portaobjetos Superfrost Plus, después se procesaron para tinción con hematoxilina/eosina. A continuación, dos observadores independientes realizaron un examen microscópico de todas las secciones tisulares de una manera oculta, puntuando áreas queratinizadas (“perlas de queratina”) como una medida del grado de diferenciación terminal (Modjtahedi *et al.*, 1994). La Tabla 7 indica los resultados obtenidos. Los ratones tratados con una mezcla de tres anticuerpos contra EGFR (992+1024+1030, grupo 1) tuvieron focos notablemente más grandes y más numerosos de células cancerosas con diferenciación terminal, en comparación con los ratones tratados con los anticuerpos de referencia, Erbitux y Vectibix (Grupos 2 y 3, respectivamente). En el grupo de control que recibió PBS en lugar de anticuerpo (grupo 4) no se detectó diferenciación terminal.

10 Usando un microscopio que tenía una cámara digital, se tomaron imágenes representativas al microscopio, véase la figura 26.

15 En conclusión, una combinación de tres anticuerpos contra EGFR con epítomos no solapantes dentro del dominio III (clones 992, 1030 y 1042), mostró un efecto inductor de diferenciación, potenciado, inesperado, en las células tumorales *in vivo* en comparación con los anticuerpos monoclonales Erbitux y Vectibix. Los efectos observados sobre la diferenciación terminal llevan a la conclusión de que las composiciones de los anticuerpos de la invención pueden usarse en terapia de combinación con otros agentes inductores de diferenciación, tales como, ácido retinoico y 4 fenil-butirato.

Tabla 7

Grupo	Tumor n.º	Puntuación del N.º de perlas de queratina	Comentarios
1	16	++++	perlas de queratina grandes
1	17	+++	perlas de queratina grandes
1	54	++++	perlas de queratina grandes
2	14	++	perlas de queratina pequeñas
2	45	++	perlas de queratina pequeñas
2	49	++	perlas de queratina pequeñas
3	11	++	perlas de queratina pequeñas
3	34	++	perlas de queratina pequeñas
3	56	++	perlas de queratina pequeñas
4	43	-	
4	60	-	
4	31	-	

25 Ejemplo 8d. Efecto inhibitor del crecimiento sostenido de una composición de anticuerpos de la invención.

30 Se realizó una repetición del experimento con xenoinjerto tumoral presentado en los ejemplos 8 y 8b para investigar la eficacia *in vivo* de la mezcla de anticuerpos 992+1024. En resumen, ratones BALB/c *nu/nu* recibieron inyección por vía subcutánea en el costado de 10⁶ células A431 NS. Los xenoinjertos tumorales se dejaron crecer hasta un tamaño promedio de tumor de 100 mm³ (día 7), momento en el cual los ratones se asignaron al azar en cinco grupos de nueve animales y se iniciaron los tratamientos con los anticuerpos. Los cinco grupos recibieron una dosis alta (2 mg/semana) o baja (1 mg/semana) de la mezcla 992+1024 o el anticuerpo de referencia Erbitux, o una dosis alta (2 mg/semana) de Synagis, anticuerpo de control. Todos los ratones recibieron un total de 9 inyecciones de 0,5 o 1 mg de anticuerpo dos veces a la semana comenzando el día 7 y finalizando el día 33.

35 La dosis alta (2 mg/semana) de la mezcla 992+1024 fue muy eficaz controlando el crecimiento tumoral inicial e induciendo la regresión tumoral prolongada cuando se comparó con Erbitux (P = 0,0002, figura 38). Ninguno de los animales que recibieron la mezcla de 992+1024 a una dosis de 2 mg/semana llegó a término en el período del estudio (118 días después del inicio del experimento, figura 38 y 39) un resultado significativamente mejor que en el grupo con la dosis alta de Erbitux de 2 mg/semana donde solo quedó uno de los nueve animales el día 60 (P = 0,0008, figura 39). Esto muestra el efecto sostenido del tratamiento con 992+1024 sobre la supervivencia prolongada. Aunque menos eficaz que la dosis alta, la dosis baja de la mezcla de 992+1024 (1 mg/semana) también pudo controlar el crecimiento tumoral y fue significativamente mejor en comparación con la dosis alta de

2 mg/semana de Erbitux cuando se estudiaba tanto la supresión tumoral ($P = 0,0135$, figura 38) como la supervivencia ($P = 0,0087$, figura 39). Estos resultados demuestran una fuerza superior de la combinación de 992+1024 cuando se comparan con los de Erbitux, incluso a una dosis baja. Los resultados también demuestran la inhibición del crecimiento sostenido debido a la combinación de 992+1024 en comparación con un anticuerpo monoclonal aprobado.

Ejemplo 9 Crecimiento de esferoides

Para el estudio con esferoides, a una placa de 96 pocillos de fondo redondo se añadieron 35 μ l de solución Poli-HEMA 120 mg/ml y se dejó evaporar durante una noche en una campana de flujo. Poli-HEMA impide la adhesión celular. Células A431-NS se trataron como se ha indicado anteriormente, se contaron y su concentración se ajustó a 100.000 células/ml. Después, 50 μ l de la suspensión celular (5.000 células/pocillo) se añadieron a los pocillos experimentales en las columnas 2-11 junto con 50 μ l de una solución de Matrigel al 5 %. Se añadieron 200 μ l de los medios a las filas 1 y 8 así como a las columnas 1 y 12 para disminuir el efecto de la evaporación de los medios en los pocillos experimentales. Las placas se centrifugaron a 300xg durante 5 minutos y se dejaron formar durante una noche en una incubadora humidificada a 37 °C. Al día siguiente los anticuerpos y las mezclas de anticuerpos apropiados se diluyeron a una concentración de anticuerpos total final de 20 μ g/ml en una placa de 96 pocillos vacía. Esto se realizó en DMEM complementado con 0,5 % de FBS y 1 % de P/S lo que produce una concentración final de anticuerpos de 10 μ g/ml en el pocillo con la concentración de anticuerpo más alta. Después se añadieron 150 μ l de estas soluciones a pocillos en la columna 2 de una placa de 96 pocillos y se realizó una dilución en serie con factor tres en la columna 9 de tal manera que cada pocillo contenía 100 μ l de solución de anticuerpo. Después, se añadieron 100 μ l de los medios a la columna 11. A continuación, 100 μ l de estas soluciones se transfirieron a la placa que contenía los esferoides y se dejaron incubar durante 7 días. Después, a cada pocillo, se añadieron 20 μ l de reactivo WST-1 y las placas se incubaron durante una hora a 37 °C. Después, las placas se transfirieron a un agitador de placa orbital y se dejaron otra hora. Se midió la absorbancia a 450 y 620 nm (longitud de onda de referencia) en un lector ELISA. La cantidad de células metabólicamente activas (CMA) se calculó como porcentaje del control no tratado de la siguiente manera:

$$\% CMA = \left(1 - \frac{(DO \text{ exp.} - DO \text{ medios})}{(DO \text{ sin tratar} - DO \text{ medios})} \right) \times 100$$

Una mezcla de tres anticuerpos con epítomos no solapantes dentro del dominio III (992+1030+1042) inhibe eficazmente el crecimiento de esferoides A431-NS y es más fuerte que los anticuerpos contra EGFR terapéuticos monoclonales, Erbitux y Vectibix (Figura 22).

Ejemplo 10. Unión al ECD de EGFR de Cinomolgo

Clonación del dominio extracelular de EGFR de Cinomolgo.

El dominio extracelular de EGFR de Cinomolgo, excluyendo el péptido señal, se clonó a partir de ADNc de Cinomolgo aislado de epidermis usando PCR anidada y cebadores específicos de secuencia procedentes de la secuencia publicada del EGFR humano de longitud completa (GENBANK X00588, Ullrich, A. *et al.* Nature 309(5967), 418-425 (1984)).

Reactivos de la PCR

ADNc de mono Cinomolgo aislado de epidermis de piel normal:

CytoMol Unimed, Cat. n.º: ccy34218, Lot n.º: A711054.

Tampón de reacción Phusion (5X): Finnzymes, Cat. n.º: F-518, Lote n.º: 11.

Enzima Phusion: Finnzymes, F-530S (2 U/ μ l).

dNTP 25 mM: Bioline, Cat. n.º: BIO-39029, Lote n.º: DM-103F.

Cebadores para la amplificación del ECD de EGFR de Cinomolgo incluyendo la secuencia señal parcial y el dominio transmembrana:

Cebador 5' ATG: 5'-TCTTCGGGAAGCAGCTATGC-3' (SEQ ID NO 135)

Cebador 3' Tm 2: 5'-TTCTCCACTGGGCGTAAGAG-3' (SEQ ID NO 136)

Cebadores para la amplificación por PCR anidada del ECD de EGFR de Cinomolgo, 1-1863 pb, e incorporación de los sitios de restricción XbaI, MluI y del codón de terminación antes del dominio transmembrana:

5' EGFR XbaI: 5'-ATCTGCATTCTAGACTGGAGGAAAAGAAAGTTTGCCAAGGC-3' (SEQ ID NO 137)

3' EGFR MluI: 5'-TACTCGATGACGCGTTTAGGATGGGATCTTAGGCCCGTTCC-3' (SEQ ID NO 138)

Condiciones de la PCR:

30 ciclos: temperatura de fusión 98 °C/30 s, hibridación 55 °C/30 s, extensión 72 °C/60 s. Después de 30 ciclos, los productos de la PCR se dejaron extender durante 5 min más.

Las reacciones de la PCR se realizaron con 1 µl de molde y 2 unidades de enzima Phusion en un volumen total de 50 µl de tampón de reacción que contenía dNTP 0,2 mM, cebador 0,5 µM.

Se obtuvo una banda de PCR final con una longitud aparente de aproximadamente 1800-1900 pb y se clonó en el vector de expresión. La secuencia de ADN y de proteínas del dominio extracelular clonado de EGFR de Cinomolgo se muestra en la figura 23 y la secuencia de proteínas del ECD de EGFR de Cinomolgo alineada con la del ECD de EGFR humano se muestra en la figura 24. El alineamiento de las secuencias de ADN del ECD de EGFR de Humano y del ECD de EGFR de Cinomolgo mostró una identidad de secuencia del 97,6 %, mientras que el alineamiento de secuencias de proteínas correspondientes mostró una identidad de secuencia del 98,6 %.

Demostración de la reactividad cruzada de los anticuerpos entre el dominio extracelular de EGFR de ser humano y de mono Cinomolgo en ELISA.

Para verificar que los anticuerpos contra EGFR ensayados se unían igualmente bien tanto al ECD de EGFR de ser humano como al de mono cinomolgo, y por consiguiente garantizar estudios de toxicología en monos cinomolgos, mediante un Elisa se ensayaron diluciones en serie de factor cuatro de anticuerpos comenzando desde 1 µg/ml para determinar la unión con las proteínas recombinantes del ECD de EGFR de ser humano y de mono Cinomolgo. Los anticuerpos que mostraron perfiles de unión idénticos en este ensayo se tomaron como indicativos de buenas especies para reactividad cruzada con EGFR. Los pocillos del ensayo ELISA se recubrieron con 50 µl/pocillo de EGFR de longitud completa a una concentración de 1 µg/ml en PBS durante una noche a 4 °C. A la mañana siguiente los pocillos se lavaron dos veces con PBS-T y se bloquearon durante una hora con 100 µl de PBS-T-BSA al 1 % a temperatura ambiente, seguido de un lavado doble en PBS-T. Después, a los pocillos se añadieron 50 µl de anticuerpos contra EGFR diluidos en serie y anticuerpos de control y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Después de la incubación de los anticuerpos los pocillos se lavaron cinco veces con PBS-T, seguido de incubación con 50 µl/pocillo de reactivo secundario HRP-estreptavidina diluido a 1:3000 en tampón de bloqueo e incubación a temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente los pocillos se lavaron cinco veces con PBS-T y las placas se revelaron añadiendo sustrato TMB 50 µl/pocillo y se incubaron a temperatura ambiente. Después de la incubación la reacción se detuvo por adición de H₂SO₄ 1 M; 100 µl/pocillo y placas se leyeron a una DO de 450 nm.

Reactivos ELISA:

1. Placa ELISA; NUNC Maxisorp; cat: 442404
2. Antígeno: ECD de rEGFR de ser humano; ECD de rEGFR de mono cinomolgo
3. Tampón de recubrimiento: 1 x PBS; Gibco cat: 20012-019
4. Tampón de lavado: 1xPBS/Tween 20 al 0,05 % (PBS-T)
5. Tampón de bloqueo/dilución: BSA al 1 % en PBS-T
6. Anticuerpo de cabra contra IgG humana conjugado con HRP: Serotec, Star 106P
7. TMB Plus (KemEnTec cat. n.º 4390L)
8. (H₂SO₄ 1 M)

Como se muestra en la figura 25, el ensayo ELISA descrito pudo discriminar entre anticuerpos contra el ECD de EGFR de ser humano y Cinomolgo de reactividad cruzada (Figura 25 A) y anticuerpos específicos de especies que solo reconocen el ECD de EGFR de ser humano utilizados para inmunizaciones en ratones (Figura 25B).

Ejemplo 11. Inhibición de la motilidad

La mayoría de las muertes por cáncer se producen por la diseminación de las células tumorales y posterior crecimiento en localizaciones distantes. La invasión local de tejido normal adyacente compromete las funciones homeostáticas e impide la escisión quirúrgica o radiológica del tumor. Recientes investigaciones han destacado el importante papel que desempeña la motilidad inducida promoviendo esta propagación. Se sabe que el EGFR facilita la motilidad y la propagación celular y por lo tanto la inhibición de la motilidad mediada por EGFR es un mecanismo importante de fármacos dirigidos al EGFR.

Se investigó el efecto de una mezcla de los dos anticuerpos 992 y 1024 sobre la motilidad de la línea celular de carcinoma de cabeza y cuello. Durante una noche se prepararon esferoides que consistían en 10.000 células, como se describe en el ejemplo 9. Después, los esferoides se transfirieron a matraces de cultivo celular NUNC T25 y se dejaron adherir durante una noche. Después, se añadieron 10 µg/ml de la mezcla de anticuerpos 992+1024 o de un anticuerpo de control negativo y los esferoides se incubaron durante otras 24 horas. Se tomaron imágenes a un aumento de 40x y se midió el área cubierta con las células usando el programa informático Image J.

Resultados: Como puede observarse en la Figura 27A, la adición de anticuerpos 992 y 1024, específicos de EGFR, conduce a una disminución significativa del área cubierta con las células tumorales. La motilidad se cuantifica en la Figura 27B, que muestra que la motilidad disminuye aproximadamente un 60 % en comparación con el anticuerpo de control negativo. Esta disminución en la motilidad es muy significativa p <0,01.

Por tanto, una combinación de los anticuerpos 992 y 1024 inhibe fuertemente la motilidad celular tumoral mediada

por EGFR, lo que indica que las combinaciones de anticuerpos contra EGFR podrían usarse para el tratamiento de la enfermedad diseminada.

Ejemplo 12. Regulación positiva de la involucrina mediante la composición de anticuerpos Sym004

La involucrina es un marcador de diferenciación temprana de células escamosas y una proteína que interviene en la formación de la envoltura córnea. Los niveles de involucrina pueden por tanto usarse como una medición del número de células tumorales que se han diferenciado. Los niveles de involucrina se calcularon en lisados proteicos de tumores de xenoinjertos de células A431 NS no tratados o tratados con Erbitux, Vectibix o con una mezcla de los anticuerpos 992+1030+1042 usando un kit ELISA para Involucrina disponible en el comercio (Biomedical Technologies). Se prepararon lisados tumorales homogeneizando 30-40 mg de tejidos tumorales en 1 ml de tampón RIPA usando el TissueLyzer de Qiagen. La concentración de proteínas en cada lisado aclarado se determinó usando el kit de ensayo de proteína BCA de Pierce y el nivel de involucrina se estimó usando el ensayo ELISA en 0,4 µg de proteína de cada muestra.

Resultados: como puede observarse en la Figura 27 la involucrina se encontró a niveles significativamente más altos en el grupo de tratamiento con 992+1030+1042 en comparación con el control negativo y con los grupos de tratamiento con Erbitux o Vectibix. Por tanto una combinación de los anticuerpos 992, 1030 y 1042 aumenta los niveles de involucrina en los tumores de xenoinjerto A431 NS y por lo tanto supuestamente induce un mayor grado de diferenciación de células A431 NS. Un resultado que se correlaciona bien con el alto número de perlas de queratina observado en este grupo de tratamiento particular (véase el ejemplo 8).

Ejemplo 13 Internalización de EGFR mediante la composición de anticuerpos Sym004

Algunos anticuerpos actúan induciendo la internalización de su diana en superficie. Se sabe que el EGFR experimenta internalización cuando se activa por ligando tal como EGF.

La capacidad de una mezcla de los dos anticuerpos 992 y 1024 para inducir la internalización de EGFR se investigó usando microscopía confocal. Células A431 NS y HN5 se sembraron en portaobjetos de cámaras de 8 pocillos de LabTek y se incubaron durante una noche en DMEM que contenía FBS al 0,5 %. Después, a las células se añadieron 10 µg/ml de mezcla de anticuerpos 992+1024, o del anticuerpo de control Erbitux, marcados con Alexa-488, y seguidamente se incubó durante períodos de tiempo diferentes. Se tomaron imágenes, posteriormente, a un aumento de 60x usando un microscopio confocal BioRad con un objetivo estenopeico (*pin-hole*) grande o pequeño.

Resultados: como se muestra en la Figura 29A la adición de los anticuerpos específicos de EGFR, 992 y 1024, marcados con Alexa-488, durante 2 horas conduce a la acumulación de los anticuerpos en vesículas intracelulares de las dos líneas celulares A431 NS y HN5. En cambio, Erbitux se encuentra principalmente en la superficie celular. La Figura 29B muestra imágenes de células A431 NS usando un objetivo estenopeico más pequeño, que produce imágenes de secciones más finas de las células. A partir de estas imágenes resulta obvio que los anticuerpos 992+1024 se localizan dentro de las células mientras que Erbitux se encuentra principalmente en la superficie celular. La figura 30 muestra un periodo de tiempo de la internalización mediada por 992+1024 y al cabo de tan solo 30 minutos después de la adición de los anticuerpos puede observarse en vesículas intracelulares. Después de 4 horas casi todos los anticuerpos 992+1024 se encuentran dentro de las células con una tinción superficial muy pequeña o muy débil. En cambio, Erbitux permanece en la superficie celular. También se han obtenido pruebas que muestran que la internalización inducida por 992+1024 conduce a una degradación sostenida y retirada de EGFR en las células.

Por tanto una combinación de los anticuerpos 992 y 1024 induce rápida y fuertemente la internalización de EGFR mientras que Erbitux no lo hace.

Ejemplo 14 Medición de las afinidades de los anticuerpos con resonancia de plasmón superficial.

Medición de las afinidades monovalentes de los anticuerpos IgG Sym004 contra el ECD de EGFR soluble recombinante.

Se realizaron análisis cinéticos de los anticuerpos de IgG de longitud completa de la invención en un BIAcore 2000, empleando un ensayo como se describe en Canziani, Klakamp, *et al.* 2004, Anal. Biochem, 325: 301-307, que permite la medición de afinidades monovalentes de moléculas de IgG completas contra el antígeno soluble. En resumen, aproximadamente 10.000 Ur de un anticuerpo policlonal contra Fc de IgG humana se conjugó con una superficie de microplaca CM5 de acuerdo con las instrucciones del fabricante, seguido de la captura de 25 µg de anticuerpos contra EGFR individuales de la invención o control negativo, Synagis, en la superficie de la microplaca contra Fc. La densidad de la IgG capturada se optimizó para cada clon, de tal manera que la unión de la concentración más alta del antígeno empleada en el ensayo no superó las 25 Ur. Después, para generar curvas de respuesta, se inyectaron 250 µl del ECD de EGFR humano soluble, que previamente, mediante cromatografía de exclusión en gel, se mostró que solo contenía proteína monovalente, a un caudal de 25 µl/min, en diluciones en serie con factor dos en tampón HBS-EP. La superficie de la microplaca se regeneró en ciclos separando los complejos de

anticuerpo capturado/antígeno con una inyección durante 10 segundos de H₃PO₄ 100 mM. Se realizaron análisis cinéticos restando primero la respuesta de la célula de flujo que contenía el anticuerpo de control negativo, Synagis, seguido de la resta de la respuesta generada por inyección solo del tampón HBS-EP ("referenciación doble"). La constante de la velocidad de asociación (ka) y la constante de disociación (kd) se calcularon globalmente a partir de los sensogramas generados con el programa informático BIA evaluation 4.1, proporcionado por el fabricante.

Reactivos:

1. Microplaca CM5: Biacore, Cat. n.º BR-1000-14
2. NHS: Biacore BR-1000-50
3. EDC: Biacore BR-1000-50
4. Tampón acetato 10 mM pH 4,5: Biacore, Cat. n.º BR-1003-50
5. Anticuerpo de cabra contra Fc de IgG Humana: Caltag, Cat. n.º H10500
6. Etanolamina, 1,0 M pH 8,5: Biacore BR-1000-50
7. Tampón de desarrollo 10 x HBS-EP: HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Tensioactivo P20 al 0,005 % v/v
8. Antígeno: dominio extracelular de EGFR humano con 6 etiquetas de histidina (6xHis)
9. H₃PO₄ 100 mM

A continuación, en la Tabla 8, se muestran las afinidades monovalentes calculadas de las IgG de longitud completa de la invención contra el ECD de EGFR humano soluble.

*Tabla 8. Afinidades medidas de anticuerpos IgG contra EGFR contra el receptor soluble. Las mediciones de los anticuerpos se realizaron mediante Resonancia de Plasmón Superficial en un BIAcore 2000 empleando el programa informático evaluation proporcionado por el fabricante. * La afinidad de 992 se determinó mediante Análisis Scatchard. NA. No aplicable.*

IgG	k _{ON} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{off} (1/s)	t _{1/2} (min)	K _D (nM)
992*	NA	NA	0,2	170,0
1024	1,8E+05	4,9E-03	2,4	26,7
1030	1,3E+04	3,7E-04	31,1	29,2
1254	8,1E+04	1,0E-03	11,3	12,7
1260	3,7E+04	1,6E-04	74,1	4,2
1261	1,7E+05	3,2E-03	3,6	18,6
1277	1,3E+05	5,3E-05	217,6	0,4
1284	3,2E+04	1,5E-04	78,1	4,6
1320	1,2E+05	2,8E-03	4,1	24,2
1347	2,4E+04	5,0E-04	22,9	21,4

La mayoría de los anticuerpos Sym004 ensayados reconocieron el ECD de EGFR humano soluble con afinidades en el intervalo de 10-20 nM, excepto los anticuerpos 1260, 1277 y 1284 que tuvieron afinidades más altas de 4,2 nM, 0,4 nM y 4,6 nM, respectivamente. Finalmente, se descubrió que el anticuerpo 992 se unía al ECD de EGFR soluble con una afinidad mucho más baja que la del resto de los anticuerpos ensayados. Por consiguiente, el análisis cinético de este anticuerpo tuvo que determinarse mediante análisis Scatchard que reveló una afinidad de 170 nM contra el ECD de EGFR humano soluble.

Medición de las afinidades de los anticuerpos Fab Sym004 contra el ECD de EGFR recombinante en forma inmovilizada.

Para investigar posibles diferencias en la presentación antigénica entre el ECD de EGFR presentado en forma soluble e inmovilizada, se realizó una nueva medición de la afinidad en un antígeno receptor de EGFR quimérico inmovilizado denominado EGFR-Fc (R & D Systems, 344-ER) que consistía en el ECD de EGFR humano fusionado a fragmentos Fc de IgG humana. Para este fin, se generaron fragmentos Fab de los anticuerpos IgG, 992, 1024 y 1030, para permitir la medición de afinidades monovalentes.

Producción de fragmentos Fab:

Se produjeron fragmentos Fab de los anticuerpos 992, 1024 y 1030 por digestión con papaína usando un kit de preparación de Fab de Pierce y siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, 2 mg de cada anticuerpo IgG se intercambiaron en tampón en columnas NAP-5 (Amersham Biosciences) con tampón de digestión recién preparado que contenía cisteína-HCl 20 mM, pH 7,0 siguiendo las instrucciones del fabricante. Después, una suspensión de perlas de papaína de 350 µl se lavó dos veces en el mismo tampón de digestión antes de que las perlas se centrifugasen y se desechó el sobrenadante. Los anticuerpos se sometieron a digestión añadiendo a las perlas 1 ml

de anticuerpo de IgG intercambiado en tampón e incubando durante una noche a 37 °C con agitación a 1000 rpm. A la mañana siguiente, los anticuerpos de IgG no digeridos se separaron del Fab bruto por empobrecimiento de IgG de longitud completa en columnas de proteína A HiTrap (GE Healthcare). El Fab producido se dializó finalmente contra PBS durante una noche y se analizó con SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras. Una banda de proteína de aproximadamente 50 kDa en condiciones no reductoras se tomó como un indicativo de la producción satisfactoria de Fab.

Reactivos:

1. Kit de preparación de Fab ImmunoPure; Pierce; cat. n.º 44885
2. Columna desalinizadora NAP5; Amersham, Cat. n.º 17-0853-02
3. PBS pH 7,2; Gibco; n.º 20012-019
4. Proteína A HP HiTrap, columna de 1 ml; GE Healthcare; n.º 17-0402-01
5. NuPAGE 4-12 % Gel Bis-Tris Novex; Invitrogen; n.º NP0322BOX
6. Marcador molecular; Seebblue Plus 2,; Invitrogen; n.º LC5925
7. Anticuerpos contra EGFR - 2,0 mg de cada uno

Se realizó un análisis cinético de los anticuerpos Fab de la invención en un Biacore 2000, usando antígeno recombinante inmovilizado sobre la superficie detectora a una densidad muy baja para impedir limitaciones en cuanto al transporte masivo. En resumen, un total de 285 Ur de quimera Fc-ECD EGFR recombinante (R&D Systems, Cat. No. 344-ER) se conjugó con una superficie de microplaca CM5 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después, los fragmentos Fab procedentes de los anticuerpos de la invención se ensayaron en diluciones en serie de factor dos, comenzando a una concentración optimizada que no produjo valores Ur máx. superiores a 25 cuando se ensayaron en la microplaca con EGFR inmovilizado. El análisis cinético se realizó restando en primer lugar la respuesta generada por inyección solo de tampón HBS-EP. La constante de velocidad de asociación (k_a) y la constante de disociación (k_d) se evaluaron globalmente a partir de los sensogramas generados con el programa informático BIA evaluation 4.1 proporcionado por el fabricante.

En la siguiente Tabla 9 se muestran las afinidades calculadas de los fragmentos Fab ensayados de la invención contra el ECD de EGFR Humano inmovilizado.

*Tabla 9. Afinidades medidas de los anticuerpos Fab contra EGFR contra el receptor inmovilizado. Las mediciones de los anticuerpos se realizaron por Resonancia de Plasmón Superficial en un BIAcore 2000 empleando el programa informático evaluation proporcionado por el fabricante. * La afinidad de 992 se determinó mediante Análisis Scatchard. NA. No aplicable.*

Fab	k_{ON} ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{off} (1/s)	$t_{1/2}$ (min)	K_D (nM)
Fab 992*	NA	NA	0,2	150,0
Fab 1024	1,9E+05	4,9E-03	2,3	25,6
Fab 1030	8,7E+04	2,0E-04	57,5	2,3

Como se presenta en la Tabla 9 anterior, se encontró que los fragmentos Fab de 992 y 1024 tenían afinidades de 150 nM y 26 nM respectivamente de acuerdo con las afinidades presentadas en el ejemplo anterior, que ilustran diferencias minoritarias en el reconocimiento del anticuerpo contra EGFR soluble e inmovilizado para estos dos anticuerpos. Sin embargo, el anticuerpo 1030 mostró una afinidad diez veces más alta de 2,3 nM contra el antígeno inmovilizado en comparación con el receptor soluble y por consiguiente reconoció preferencialmente un epítipo expuesto en el antígeno inmovilizado.

Ejemplo 15: Investigación de la presentación antigénica de EGFR y clasificación de afinidades funcionales en células A431-NS.

Comparación entre la presentación antigénica en células A431-NS y el receptor de EGFR de longitud completa purificado.

Dado que los análisis cinéticos revelaron que el anticuerpo 992 reconocía el ECD de EGFR recombinante con una afinidad entre 150-170 nM, se investigó si esta afinidad débil se debía al hecho de que el mAb 992 se unía preferencialmente a conformaciones nativas de EGFR, como se expresa en células A431-NS a diferencia de conformaciones presentadas en el ECD de EGFR recombinante o EGFR de longitud completa purificado de células A431. Para investigar diferencias en las presentaciones antigénicas del receptor de EGF, se realizaron estudios de unión ELISA simultáneos de una subpoblación de los anticuerpos de la invención con fragmentos Fab para impedir efectos de avidéz sobre las células A431-NS ensayadas y EGFR de longitud completa purificado de las mismas células.

Producción de Fab: la producción de fragmentos Fab se realizó como se ha descrito en el ejemplo 14.

ELISA Indirecto: para el ELISA indirecto, el EGFR de longitud completa (Sigma E2645) se recubrió a 1 µg/ml en tampón carbonato (50 µl/pocillo) durante una noche a 4 °C. A la mañana siguiente, los pocillos se lavaron dos veces con PBS-T y se bloquearon durante una hora con PBS-T que contenía BSA al 1 % a temperatura ambiente seguido de dos lavados en PBS-T. Después, se añadieron 50 µl de diluciones en serie de anticuerpos Fab en DMEM que contenía BSA al 1 % a pocillos ELISA independientes y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, después de lo cual los pocillos se lavaron cuatro veces con PBS-T. A continuación se añadieron 50 µl de un anticuerpo secundario de cabra contra ser humano (específico de Fab) conjugado con HRP, diluido a 1:5000 en DMEM que contenía BSA al 1 % y se incubó en hielo durante 30 min. Finalmente los pocillos se lavaron cuatro veces con PBS-T y las placas se revelaron añadiendo sustrato TMB 50 µl/pocillo y se leyeron a 620 nm cada 5-15-30 min. Después de la incubación con sustrato, la reacción se detuvo por adición de H₂SO₄ 1 M y se leyó la absorbancia a 450 nm.

Reactivos, ELISA indirecto

- 1) Tampón de recubrimiento: tampón de Carbonato 50 mM, pH 9,8
- 2) Antígenos: EGFR de longitud completa de tipo silvestre purificado de células A431; Sigma E2645
- 3) Placas ELISA: NUNC Maxisorp; Cat. n.º: 442404
- 4) Tampón de lavado: 1x PBS/0,05 % Tween 20 (PBS-T)
- 5) Tampón de bloqueo/dilución: BSA al 1 % en PBS-T (PBS-T-1 % BSA)
- 6) Tampón de dilución de anticuerpos: DMEM que contiene BSA al 1 %
- 7) Anticuerpo de cabra contra ser humano (específico de Fab) conjugado con HRP: Jackson, Cat. n.º 109-035-097
- 8) Sustrato TMB Plus: KemEnTec, Cat. n.º 4390L
- 9) H₂SO₄ 1M

ELISA celular: las afinidades de unión relativas definidas como la concentración molar que proporciona una DO media máxima (DE50) se determinaron por titulaciones de anticuerpos en células A431-NS. En resumen, 10.000 células A431-NS se cultivaron en placas ELISA de 96 pocillos que contenían DMEM con FCS añadido al 0,5 % y P/S al 1 % a 37 °C, con CO₂ al 5 % durante una noche. A la mañana siguiente las células confluentes (aproximadamente 20.000/pocillo) se lavaron dos veces con PBS y se fijaron mediante incubación con una solución de paraformaldehído al 1 % durante 15 min a temperatura ambiente seguido de un lavado de cuatro veces con PBS. Después, los anticuerpos contra EGFR ensayados y el anticuerpo de control negativo Synagis se diluyeron en serie en DMEM que contenía BSA al 1 % y se añadieron 50 µl de cada dilución a los pocillos y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, después de lo cual los pocillos se lavaron cuatro veces con PBS. Después se añadieron 50 µl de un anticuerpo secundario de cabra contra ser humano (específico de Fab) conjugado con HRP diluido a 1:5000 en DMEM que contenía BSA al 1 % y se incubaron en hielo durante 30 min. Finalmente los pocillos se lavaron cuatro veces con PBS y las placas se revelaron añadiendo 50 µl/pocillo de sustrato TMB Plus y se leyeron a 620 nm cada 5-15-30 min. Después de la incubación con sustrato la reacción se detuvo por adición de H₂SO₄ 1 M y se leyó la absorbancia a 450 nm. La afinidad funcional expresada como valores DE50 se calculó restando la unión de fondo promedio con el reactivo secundario solo, seguido por normalización de las curvas de unión representando el % relativo de unión máxima de cada anticuerpo ensayado.

Reactivos, ELISA celular:

- 1) Medio DMEM: Gibco, Cat. n.º 41966-029
- 2) FCS: Gibco, Cat. n.º 10099-141
- 3) Penicilina - estreptomycin (P/S): Gibco, , Cat. n.º 15140-122
- 4) Placa ELISA: Costar, Cat. n.º 3595
- 5) Tampón de lavado (PBS): Gibco cat. 20012-019
- 6) Tampón de dilución de anticuerpo: DMEM que contiene BSA al 1%
- 7) Solución de fijación celular: BD Biosciences, Cat. n.º 340181
- 8) Anticuerpo de cabra contra ser humano (específico de Fab) conjugado con HRP: Jackson, Cat. n.º 109-035-097
- 9) Sustrato TMB Plus: KemEnTec, Cat. n.º 4390L
- 10) H₂SO₄ 1M

Las diferencias en la presentación antigénica sobre el receptor de EGF expresado en células A431-NS y sobre receptor purificado de las mismas células, se determinaron con estudios de unión ELISA simultáneos empleando el mismo reactivo de anticuerpo secundario y tiempos de incubación. Los resultados se muestran en la Figura 31. El experimento muestra claramente que los anticuerpos Fab 992 y 1024 se unen débilmente al EGFR de longitud completa purificado aplicado a pocillos ELISA cuando se compararon con la unión de las mismas concentraciones de Fab 1030. Sin embargo, esta débil afinidad de unión de 992 y 1024 se reestableció cuando los anticuerpos se ensayaron en células A431-NS contra las cuales los tres Fab mostraron una fuerte actividad de unión. La comparación de los dos ensayos ELISA diferentes ilustra claramente una preferencia de los Fab 992 y 1024 por la unión a conformaciones de EGFR nativas como se expresa en superficies celulares a diferencia de las conformaciones presentadas en el antígeno purificado en pocillos ELISA. El resultado también sugiere que la débil afinidad aparente de 992, medida con resonancia de plasmón superficial, en ECD de EGFR soluble recombinante e inmovilizado se debía a una presentación desfavorable del epítipo del anticuerpo 992 en los sistemas ensayados.

Clasificación de afinidades funcionales en células A431-NS.

El ELISA celular realizado como se describe anteriormente se usó para clasificar las afinidades funcionales de IgG y fragmentos Fab de 992, 1024, 1030, Vectibix y Erbitux calculando los valores DO máximos medios expresados como valores DE50. El resultado de estos análisis se muestran en la Figura 32 y los valores DE50 calculados se presentan en la siguiente Tabla 10.

5

Tabla 10: Clasificación de afinidades funcionales expresadas como valores DE50 basándose en efectos de avidéz de IgG o afinidad monovalente de Fab. Los valores de DE50 se determinaron mediante titulaciones de anticuerpos en serie en células A431-NS. DT: desviación típica del ajuste de curva.

Avidéz de IgG			
IgG	Log DE50	DE50 nM	DT
992	-0,56	0,3	0,04
1024	-0,49	0,3	0,05
1030	0,17	1,5	0,02
Vectibix	-0,15	0,7	0,04
Erbitux	-0,23	0,6	0,04
Afinidad de Fab			
Fab	Log DE50	DE50 nM	DT
992	1,00	9,9	0,11
1024	0,30	2,0	0,02
1030	0,27	1,8	0,05
Vectibix	0,08	1,2	0,04
Erbitux	-0,07	0,8	0,06

El experimento muestra claramente que cuando se tienen en cuenta los efectos de avidéz, IgG 992 y 1024 parecen unirse a células A431-NS con mayor avidéz que con Erbitux y Vectibix, mientras que IgG 1030 tuvo una afinidad más baja de los anticuerpos IgG ensayados. Sin embargo, cuando la afinidad monovalente en células se determinó usando fragmentos Fab, 992 tuvo la afinidad más baja de aproximadamente 10 nM. Sin embargo, esta afinidad funcional monovalente era aún al menos 15 veces más baja que la ensayada con BIAcore.

15

Ejemplo 16: investigación de la potenciación de unión inducida por anticuerpos.

El experimento de competición BIAcore realizado sobre pares de anticuerpos de la invención reveló que la unión de 992 y 1024 se potenciaba aproximadamente un 55 % y 58 % respectivamente (Figura 9A), cuando estos anticuerpos se ensayaron uno frente a otro en ambas direcciones. Para investigar adicionalmente este fenómeno, se diseñó un ensayo ELISA celular usando células no fijas para investigar el efecto de la unión de IgG de un clon de anticuerpo después de la saturación previa del receptor con el fragmento Fab de un anticuerpo de unión a un epítipo no solapante.

25

ELISA celular: el ELISA se realizó esencialmente como se describe en el Ejemplo 15 con modificaciones. Las células se dejaron sin fijar para permitir flexibilidad de EGFR conformacional después de las adiciones de los anticuerpos. En resumen, se cultivaron 10.000 células A431-NS en placas ELISA de 96 pocillos que contenían DMEM con FCS al 0,5 % añadido y P/S al 1 % a 37 °C, con CO₂ al 5 % durante una noche. A la mañana siguiente las células confluentes (aproximadamente 20.000/pocillo) se lavaron dos veces con PBS, y los pocillos para investigar la potenciación de unión inducida por anticuerpo se preincubaron con 25 µl de fragmentos Fab sencillos 40 nM de cualquiera de 992, 1024 o 1030, o con 12,5 µl de 80 nM de cada Fab sencillo en combinaciones dobles que previamente mostraban dar una unión saturada. A los pocillos se añadieron 25 µl de DMEM que contenía BSA al 1 % usado para ensayar anticuerpos de IgG sin fragmentos Fab añadidos. Después de la adición de Fab y de medios, los pocillos ELISA se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente, después de lo cual 25 µl de diluciones en serie de factor tres de las IgG de la invención o de control negativo Synagis, comenzando a una concentración de 360 nM, se añadieron a los pocillos y se incubaron en hielo durante una hora. Después, los pocillos se lavaron cuatro veces con PBS y se añadieron 50 µl de un anticuerpo secundario monoclonal de ratón contra ser humano (específico de Fc) conjugado con HRP diluido a 1:5000 en DMEM que contenía BSA al 1 % y se incubaron en hielo durante 30 min. Finalmente los pocillos se lavaron cuatro veces con PBS y las placas se revelaron por adición de sustrato TMB 50 µl/pocillo y se leyeron a 620 nm cada 5-15-30 min. Después de la incubación con sustrato la reacción se detuvo por adición de H₂SO₄ 1 M y la absorbancia se leyó a 450 nm. La afinidad funcional expresada como valores DE50 se calculó restando la unión fondo promedio solo con reactivo secundario, seguido por normalización de las curvas de unión representando el % de unión máxima relativa para cada anticuerpo ensayado.

45

Reactivos, ensayo ELISA celular:

- 1) Medio DMEM: Gibco, Cat. n.º 41966-029
- 2) FCS: Gibco, Cat. n.º 10099-141
- 3) Penicilina - Estreptomina (P/S): Gibco, , Cat. n.º 15140-122
- 4) Placa ELISA: Costar, Cat. n.º 3595
- 5) Tampón de lavado (PBS): Gibco cat. 20012-019
- 6) Tampón de dilución de anticuerpos: DMEM que contiene BSA al 1 %
- 7) Anticuerpo de ratón contra ser humano (específico de Fc) conjugado con HRP: Ab-directo, Cat. n.º MCA647P
- 8) Sustrato TMB Plus: KemEnTec, Cat. n.º 4390L
- 9) H₂SO₄ 1M

Se determinaron investigaciones de potenciaciones de unión inducidas por anticuerpo mediante estudios de unión ELISA simultáneos empleando el mismo reactivo de anticuerpo secundario y los tiempos de incubación. Los resultados del estudio se muestran en la figura 33 y los valores DE50 calculados en la siguiente Tabla 11.

Tabla 11: clasificación de afinidades funcionales expresadas como valores DE50 basándose en efectos de avidéz de IgG con o sin saturación previa del receptor con los fragmentos Fab indicados. Los valores DE50 se determinaron mediante titulaciones de anticuerpos IgG en serie en células A431-NS. DT: desviación típica de ajuste de curva.

IgG	Log DE50	DE50 nM	DT
IgG 992	-0,24	0,6	0,07
IgG 992 / Fab 1024	-0,31	0,5	0,02
IgG 992 / Fab 1030	-0,38	0,4	0,05
IgG 992 / Fab 1024 y 1030	-0,34	0,5	0,04
IgG 1024	-0,01	1,0	0,01
IgG 1024 / Fab 992	-0,05	0,9	0,04
IgG 1024 / Fab 992 y 1030	-0,08	0,8	0,02
IgG 1030	0,33	2,2	0,06
IgG 1030 / Fab 992	0,20	1,6	0,03
IgG 1030 / Fab 992 y 1024	0,34	2,2	0,06

Como se presenta en la Figura 33 y en la Tabla 11 anterior, IgG 992 mostró una clara potenciación de unión después de saturación previa del receptor con fragmentos Fab de cualquiera de 1024 o 1030 o 1024 junto con 1030. La incubación con fragmentos Fab produjo valores DE50 disminuidos de 0,5; 0,4 y 0,5 nM respectivamente en comparación con 0,6 nM cuando IgG 992 se ensayó en solitario. Del mismo modo, IgG 1024 y 1030 también mostraron unión aumentada cuando las células se saturaron primero con Fab 992 y solo con 1024 cuando se añadieron tanto Fab 992 como 1030 a las células antes de IgG. Este resultado ilustra claramente la utilidad de tener más de un anticuerpo contra epítomos no solapantes en el mismo receptor diana.

En este experimento se determinaron las afinidades funcionales ligeramente más bajas en comparación con el ejemplo 2. Este resultado se debe probablemente a que se usó un reactivo secundario diferente en el presente ejemplo y a que las IgG ensayadas se incubaron con células no fijas en hielo para impedir la internalización.

Ejemplo 16B. Clonación de EGFR de Cinomolgo de longitud completa.

El EGFR de Cinomolgo de longitud completa, incluyendo el péptido señal, se clonó de ADNc de Cinomolgo aislado de epidermis usando PCR anidada y cebadores específicos de secuencia procedentes de la secuencia publicada del EGFR humano de longitud completa (GENBANK X00588, Ullrich, A. *et al.* Nature 309(5967), 418-425 (1984)).

Reactivos de la PCR:

ADNc de Mono Cinomolgo aislado de epidermis de piel normal:

- CytoMol Unimed, Cat. n.º: ccy34218, Lot n.º: A711054.
- Tampón de reacción FastStart (10X): Roche, Cat. n.º: 03 553 361 001
- Enzima FastStart: Roche, Roche, Cat. n.º: 03 553 361 001
- Enzima Phusion: Finnzymes, F-530S (2 U/µl).
- dNTP 25 mM: Bioline, Cat. n.º: BIO-39029

Cebadores para la amplificación del EGFR de Cinomolgo de longitud completa incluyendo la secuencia señal:

Cebador 5' ATG: 5'-TCTTCGGGAAGCAGCTATGC-3' (SEQ ID NO 135)

Cebador de terminación 3': TCATGCTCCAATAAATTCCTG -3' (SEQ ID NO 139)

Condiciones de la PCR:

5 95 °C/2 min, 40 ciclos: 95 °C/30 s, 55 °C/30 s, 72 °C/3 min 30 s con una incubación final a 72 °C durante 5 min.

Cebadores para la amplificación de EGFR de Cinomolgo de longitud completa por PCR anidada e incorporando sitios de restricción Not y Xho:

10 Not5' Cin E579 5' - GGAGTCGGCGGCCGCACCATGCGACCCTCCGGGACGG-3 (SEQ ID NO 140)
Xho5' Cin E580 5' - GCATGTGACTCGAGTCATGCTCCAATAAATTCCTG-3 (SEQ ID NO 141)

Condiciones de la PCR:

15 95 °C/2 min, después 30 ciclos: temperatura de fusión 95 °C/30 s, hibridación a 55 °C/30 s, extensión 72 °C/3 min. Después de 30 ciclos los productos PCR se dejaron extender durante 10 min más.

20 Las reacciones PCR se realizaron con molde 0,5 µl y Enzima Phusion 0,1 µl, enzima FastStart 0,4 µl en un volumen total de tampón de reacción de 50 µl con una concentración final de tampón FastStart 1 x, dNTP 0,2 mM y 0,2 µM de cada cebador.

25 Se obtuvo un fragmento PCR con una longitud aparente de aproximadamente 4000 pb y se clonó usando el kit de clonación TOPO TA (Invitrogen, Part n.º 4506-41) y se secuenció. La secuencia de ADN y de proteínas del EGFR de Cinomolgo clonado se muestra en la figura 34. Un alineamiento de las secuencias de proteínas del EGFR de Cinomolgo y del EGFR de ser humano mostró una identidad de secuencia del 99,2 %.

Demostración, mediante análisis FACS, de la reactividad cruzada de los anticuerpos entre el EGFR de Cinomolgo y Humano de longitud completa.

30 Los EGFR de mono Cinomolgo y de ser humano de longitud completa se expresaron en la superficie de células CHO mediante transfección estable, y mediante análisis FACS se ensayó la unión de las células frente a un panel de anticuerpos contra EGFR diluidos en serie. Las determinaciones se realizaron en condiciones dependientes de K_D , manteniendo un exceso molar de anticuerpo que fue al menos 5 veces mayor que el número de moléculas de antígeno de EGFR expresadas en la superficie celular de un número fijo de células en todas las series de dilución de los anticuerpos. Esta configuración permitió el análisis FACS de la unión de anticuerpos a una saturación completa del receptor en todas las concentraciones de anticuerpo ensayadas.

40 En resumen, en un Sistema Bioanalyzer de matriz BD FACS, se realizó análisis FACS cuantitativo para determinar el número de moléculas de EGFR expresadas en la superficie de células CHO transfectadas con EGFR de longitud completa de ser humano o de mono Cinomolgo. El análisis se realizó titulando IgG Erbitux marcado con PE en las células y determinado el número de moléculas con PE equivalentes por comparación con una curva convencional constituida a partir de partículas de calibración Rainbow con densidad de PE conocida. El análisis cuantitativo reveló que las células CHO transfectadas con EGFR presentaron aproximadamente 350.000 moléculas en la superficie de cada célula. Después, se compararon diluciones en serie con factor 5 de anticuerpos de la invención comenzando a 45 5 nM incubando con 10.000 células CHO transfectadas con EGFR en volúmenes en aumento, permitiendo un exceso molar de anticuerpo de al menos 5 veces sobre el antígeno EGFR presentado en la superficie en cada determinación. Los anticuerpos se incubaron con células durante 14 horas en un agitador, para promover la saturación completa del antígeno en todas las concentraciones de anticuerpo ensayadas, al mismo tiempo que se añadió tampón FACS NaN_3 al 0,02 % y la temperatura se mantuvo a 4 °C para impedir la internalización del receptor. Después de la incubación, las células se sedimentaron a 1200 RPM durante 5 min a 4 °C y se resuspendieron en tampón FACS 200 µl. Después, las células se tiñeron con un anticuerpo secundario de cabra contra F(ab')_2 FcGamma de IgG humana conjugado con PE diluido a 1:500 y se incubó durante 30 min a 4 °C en un agitador. Finalmente las células se lavaron dos veces en tampón FACS y se analizaron en un Sistema Bioanalyzer de matriz BD FACS con selección en células CHO que expresan EGFR que presentan propiedades uniformes de 55 dispersión directa/lateral.

Reactivos FACS:

60 Partículas de calibración Rainbow: BD, cat. n.º: 559123
Tampón FACS: 1xPBS + FCS al 2 % + NaN_3 al 0,02 %
Anticuerpo de cabra contra F(ab')_2 FcGamma de IgG humana conjugado con PE: Jackson ImmunoResearch, cat. n.º 109-116-170

65 El ensayo de unión FACS descrito se usó para la determinación de la reactividad cruzada de los anticuerpos EGFR IgG 992 y 1024 y comparar con un anticuerpo de control IgG 1320, que no reaccionó en cruzado con el EGFR de Cinomolgo. Como se muestra en la Figura 40 más adelante, el ensayo FACS descrito fue muy bueno discriminando

5 anticuerpos que presentaban buena reactividad cruzada entre el EGFR de ser humano y de cinomolgo de longitud completa (Figura 40A, IgG 992 y Figura 40B, IgG 1024) y anticuerpos específicos de especie que solo reconocen el EGFR de ser humano de longitud completa (Figura 40C, IgG 1320). A partir de este análisis se llegó a la conclusión de que ambas IgG, 992 y 1024, mostraron excelente reactividad cruzada contra ambos EGFR, el de ser humano y el de Cinomolgo, de longitud completa, expresados en la superficie de células CHO transfectadas de manera estable. La diferencia en cuanto a la unión entre el EGFR de cinomolgo y de ser humano es sorprendente a la vista del alto grado de similitud de secuencia y resalta la importancia de los anticuerpos de ensayo por la unión con la secuencia diana exacta en los animales utilizados para estudios toxicológicos preclínicos.

10 Ejemplo 17. *Clones homólogos a 992, 1024 y 1030*

15 La exploración de clones de los anticuerpos de unión a EGFR, basándose en ensayos inmunoabsorbentes (ensayos ELISA y basados en células), condujo a la identificación de los clones 992, 1024, 1030, como se describe en los ejemplos anteriores. También se identificaron clones específicos de EGFR, homólogos a 992, 1024 y 1030 (Tabla 12).

20 Se espera que los clones pertenecientes al mismo grupo tengan la misma especificidad de unión pero que puedan unirse con afinidades diferentes. Por lo tanto, los clones dentro de un grupo pueden reemplazarse entre sí en las composiciones de anticuerpos de la presente invención, siempre que las afinidades de unión de los clones no sean demasiado diferentes.

Tabla 12	IGHV	Gen IGHV	Gen IGHJ	CDR3	SEQ ID NO	Número de mutaciones somáticas	Mutaciones somáticas
992	1209	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	CTRNGDYVYSS- GDAMDYW	110	4	H46P,G61R,G76A,H9 0Q
	1204	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	CTRNGDYVYSS- GDAMDYW	111	5	H46P,G59D,G61R,G76A,H90Q
	992	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	CTRNGDYVYSS- GDAMDYW	111	4	H46P,G61R,G76A,H9 0Q
	996	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	CTRNGDYVYSS- GDAMDYW	111	4	H46P,G61R,G76A,H9 0Q
	1033	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	CTRNGDYVYSS- GDAMDYW	111	4	H46P,G61R,G76A,H9 0Q
1030	1220	IGHV1S22*01	IGHJ4*01	CTRNGDYVYSS- GDAMDYW	111	4	H46P,G61R,G76A,H9 0Q
	1195	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAM- DYW	112	12	K14R,M39L,T55S,S58 G,G59V,Y62T,T63Y,Y 66- Y67F,I78M,K84R, T86I
	1030	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAM- DYW	112	12	M39L,K48R,T55S,S58 G,G59V,Y62T,T63Y,Y 66- Y67F,I78M,K84R, T86I
	1034	IGHV5S12*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAM- DYW	112	12	M39L,T55S,I56T,S58 G,G59V,Y62T,T63Y,Y 66- Y67F,I78M,K84R, T86I
	1194	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAM- DYW	112	12	M39L,T55S,S58G,G5 9V,Y62T,T63Y,Y66-Y 67F,D69G,I78M, K84R,T86I

(continuación)

Tabla 12 Grupo	IGHV Nombre del clon	Gen IGHV	Gen IGHJ	CDR3	SEQ ID NO	Número de mutaciones somáticas	Mutaciones somáticas
	980	IGHV5S12*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAM- DYW	112	11	M39L, T55S, S58G, G5 9V, Y62T, T63Y, Y66-, Y 67F, I78M, K84R, T86I
	981	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAM- DYW	112	11	M39L, T55S, S58G, G5 9V, Y62T, T63Y, Y66-, Y 67F, I78M, K84R, T86I
	1246	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAM- DYW	112	11	M39L, T55S, S58G, G5 9V, Y62T, T63Y, Y66-, Y 67F, I78M, K84R, T86I
	1223	IGHV5S9*01	IGHJ4*01	CARGSDGYFYAM- DYW	112	12	S32N, M39L, T55S, S58 G, G59V, Y62T, T63Y, Y 66-, Y67F, I78M, K84R, T86I
1024	1031	IGHV1 S128*01	IGHJ4*01	CARYYGYDDAM- DYW	113	6	Y33H, K43Q, N57H, S7 4N, S84P, P94L
	1036	IGHV1 S128*01	IGHJ4*01	CARYYGYDDAM- DYW	113	6	Y33H, K43Q, N57H, S7 4N, S84P, P94L
	1042	IGHV1 S128*01	IGHJ4*01	CARYYGYDDAM- DYW	113	6	Y33H, K43Q, N57H, S7 4N, S84P, P94L
	984	IGHV1 S128*01	IGHJ4*01	CARYYGYDDAM- DYW	113	7	Y33H, K43Q, N57H, S7 4N, T79A, S84P, P94L
	1024	IGHV1 S128*01	IGHJ4*01	CVRYYGYDEAM- DYW	114	7	K14E, A17G, Y33H, N6 0S, T63N, L91 F, P94L
	1210	IGHV1 S128*01	IGHJ4*01	CVRYYGYDEVM- DYW	115	7	K14E, A17G, Y33H, N6 0S, T63N, L91 F, P94L
	1217	IGHV1 S128*01	IGHJ4*01	CVRYYGYDEVM- DYW	115	7	K14E, A17G, Y33H, N6 0S, T63N, L91 F, P94L
	1221	IGHV1 S128*01	IGHJ4*01	CVRYYGYDEVM- DYW	115	7	K14E, A17G, Y33H, N6 0S, T63N, L91 F, P94L

Tabla 12		IGHV	Gen IGHV	Gen IGHJ	CDR3	SEQ ID NO	Número de mutaciones somáticas	Mutaciones somáticas
Grupo	Nombre del clon	Gen IGHV	Gen IGHJ	CDR3	SEQ ID NO	Número de mutaciones somáticas	Mutaciones somáticas	
992	1209	IGKV10-96*01	IGKJ1*02	CQHYNTPPTF	116	6	A25T,S30G,Y87F,S92N,L94VJ99V	
	1204	IGKV10-96*01	IGKJ1*02	CQHYNTPPTF	116	6	A25T,S30G,Y87F,S92N,L94VJ99V	
	992	IGKV10-96*01	IGKJ1*02	CQHYNTPPTF	116	6	A25T,S30G,Y87F,S92N,L94VJ99V	
	996	IGKV10-96*01	IGKJ1*02	CQHYNTPPTF	116	7	T8A,A25T,S30G,Y87F,S92N,L94VJ99V	
	1033	IGKV10-94*03	IGKJ2*01	CQQFTTSPFTF	117	8	A25T,I29V,S30G,Y87F,N93S,L94M,P96G,I9 9V	
	1220	IGKV10-96*01	IGKJ1*02	CQHYNTPPTF	118	6	A25T,S30G,Y87F,S92N,L94VJ99V	
1030	1195	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	3	K27Q,Y36F,Q44L	
	1030	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	2	Y36F,Q44L	
	1034	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	2	Y36F,Q44L	
	1194	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	2	Y36F,Q44L	
	980	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	3	Y36F,Q44L,Q48R	
	981	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	3	Y36F,Q44L,H92Y	
	1246	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	2	Y36F,Q44L	
	1223	IGKV3-12*01	IGKJ2*01	CQHSREFPLTF	119	2	Y36F,Q44L	
1024	1031	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	0		
	1036	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	1	T85A	
	1042	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	1	G84R	
	984	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	0		
	1024	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	0		
	1210	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	1	T17A	
	1217	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	0		
	1221	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	1	S32N	
	1218	IGKV2-109*01	IGKJ2*01	CAQNLELPYTF	120	0		

Ejemplo 18: humanización de los anticuerpos 922 y 1024

Todos los anticuerpos contienen la posibilidad de suscitar una respuesta contra anticuerpos humanos. La respuesta se correlaciona hasta cierto punto con el grado de "humanidad" del anticuerpo terapéutico aplicado. No es posible predecir la inmunogenicidad y por lo tanto la respuesta contra anticuerpos humanos, pero hay una tendencia hacia anticuerpos de preferencia con un alto grado de humanidad para su uso clínico. La humanidad de los anticuerpos descritos en la presente invención puede aumentarse mediante un proceso de humanización [Reichert JM. Monoclonal antibodies in the clinic. *Nature Biotechnol*, 2001; 19: 819-822; Reichert JM, Rosensweig CJ, Faden LB y Dewitz MC. Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nature Biotechnol*, 2005; 23: 1073-1078].

La humanización de un anticuerpo monoclonal murino se realiza en teoría injertando las regiones determinantes de complementariedad (CDR, *Complementarity Determining Regions*) en regiones marco conservadas (FR, *Framework Regions*) humanas de los dominios IGHV e IGKV con secuencias estrechamente relacionadas mediante un procedimiento comúnmente denominado injerto de CDR (Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS y Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*, 1986; 321: 522-525). Sin embargo, el injerto de CDR sencillo de solo las regiones hipervariables puede dar como resultado una afinidad disminuida debido a que algunos aminoácidos almacén o regiones marco conservadas establecen contactos cruciales con el antígeno o dan soporte a la conformación de los bucles de la CDR de unión antigénica [Queen C, Schneider WP, Selick HE, Payne PW, Landolfi NF, Duncan JF, Avdalovic NM, Levitt M, Junghans RP y Waldmann TA. A humanized antibody that binds to the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86: 10029-10033; Al-Lazikani B, Lesk AM y Chothia C. Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol*, 1997; 273: 927-948]. Por consiguiente la humanización de anticuerpos debe implicar tanto el injerto de bucles de CDR de las regiones variables derivadas de murino sobre un almacén humano estrechamente homólogo como la conservación, al mismo tiempo, de restos almacén murinos clave con influencia documentada sobre la actividad de unión antigénica (Winter, G. y W. J. Harris. "Humanized antibodies". *Immunol.Today* 14.6 (1993): 243-46). Se han desarrollado diversos métodos y se han aplicado satisfactoriamente para conseguir la humanización conservando al mismo tiempo la afinidad y función de los anticuerpos (revisado en Almagro, J. C. y J. Fransson. "Humanization of antibodies." *Front Biosci*. 13 (2008): 1619-33.). La humanización puede realizarse mediante métodos lógicos, por ejemplo, injerto de CDR, modificación de superficies, superhumanización, optimización del contenido de la cadena humana, todo ellos basándose en la construcción de algunos candidatos de anticuerpos humanizados. La secuencia de aminoácidos de los candidatos se basa en el entendimiento y la predicción de la estructura de los anticuerpos y en la contribución de los aminoácidos individuales hacia la unión antigénica, tanto directa como indirectamente, a través de la estabilización de la estructura global de las regiones de interacción con el antígeno. Normalmente, los candidatos tienen que refinarse y algunos aminoácidos retromutarse en el resto murino original ya que cada anticuerpo tiene algunas limitaciones individuales inesperadas. Común para los métodos es que pueden necesitarse diversas rondas sucesivas de diseño, ensayo y rediseño para conservar la afinidad y las funciones. Las alternativas son los métodos más empíricos donde se generan grandes bibliotecas combinatorias y los anticuerpos, con las características deseadas, se enriquecen a partir del conjunto de variantes mediante una selección por métodos tales como presentación en levaduras o en fagos o métodos de exploración alternativos.

Los anticuerpos contra EGFR descritos en la presente invención, pueden humanizarse mediante injerto de CDR en las regiones V humanas. En el escenario preferido, la región V humana se selecciona basándose en la homología con la región V murina original. También pueden usarse regiones génicas V humanas con otras características deseadas, tales como una inmunogenicidad baja. El presente ejemplo describe un método que se usa en la humanización de anticuerpos quiméricos contra EGFR, 992 y 1024. Las secuencias humanizadas dadas en la figura 41A se han generado injertando las regiones CDR definidas en el IMGT (*International ImMunoGeneTics*) de IGHV 992 en IGHV1-46/IGHJ4 y de IGKV 992 en IGKV1-27/IGKJ1-01. Las secuencias de aminoácidos dadas en la figura 41B se han generado con ordenador injertando las regiones CDR definidas en el IMGT de IGHV 1024 en IGHV1-2*02/*02IGHJ6*02 y de IGKV 1024 en IGKV2-28*01/IGKJ2*01. Los genes artificiales que codifican los anticuerpos humanizados especificados se sintetizan y se insertan en el vector de expresión de mamífero. Los anticuerpos se expresan, se purifican y se ensayan con respecto a su actividad como se describe en el Ejemplo 3. Después de un ensayo inicial, la cinética de unión de los anticuerpos humanizados puede determinarse mediante resonancia de plasmón superficial como se describe en el Ejemplo 14. De manera similar a la unión al hEGFR expresado en la superficie de las células puede determinarse como se describe en el Ejemplo 15.

Si la actividad de unión de los aminoácidos humanizados es significativamente más baja que la observada en los anticuerpos originales, se empleará un esquema de retromutación secuencial para la regeneración de la afinidad, comenzando con los restos almacén humanizados localizados en la zona Vernier o en restos propuestos que dan soporte a la estructura en las regiones CDR (Foote, J. y G. Winter. "Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops". *J Mol.Biol*. 224.2 (1992): 487-99; Padlan, E. A. "Anatomy of the antibody molecule." *Mol.Immunol* 31.3 (1994): 169-217.). Estos restos están en la numeración del IMGT para los números de aminoácidos 13, 45 y 80 de IGHV 992; y el aminoácido 25 de IGKV 992; los aminoácidos 13, 45, 80 y 82 de IGHV 1024; el aminoácido 78 de IGKL 10248. Estos mutantes pueden construirse usando mutagénesis dirigida a sitio mediada por PCR usando métodos de biología molecular convencionales. Los mutantes construidos se ensayarán como se describe anteriormente. Se espera que estos conjuntos de candidatos den como resultado anticuerpos

humanizados con propiedades de unión antigénica conservadas. Sin embargo, no pueden excluirse retromutaciones adicionales o maduración por afinidad introduciendo sustituciones de aminoácidos en las regiones CDR mediante mutagénesis dirigida a sitio.

5 Ejemplo 19: Anticuerpos con dos dominios variables

Una proteína de anticuerpo con dos dominios variables (DVD, *Dual Variable Domain*) se modificó por ingeniería genética fusionando los dominios IGHV de 992 y 1024 en tándem mediante un enlazador de 6 aminoácidos (ASTKGP) y los dominios IGKV de 992 y 1024 mediante un enlazador de 5 aminoácidos (TVAAP) [Wu C, Ying H, Grinnell C, Bryant S, Miller R, Clabbers A, Bose S, McCarthy D, Zhu RR, Santora L, vis-Taber R, Kunes Y, Fung E, Schwartz A, Sakorafas P, Gu J, Tarcsa E, Murtaza A y Ghayur T. Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin. *Nature Biotechnol*, 2007; 25: 1290-1297]. Las fusiones de los dos dominios IGHV e IGKV se encuentran después de los dominios IGHC e IGKC, respectivamente. En un anticuerpo DVD de longitud completa (992L1024), el IGHV e IGKV de 992 está en posición N terminal, seguido por el enlazador y el IGHV e IGKV de 1024, respectivamente. En un segundo anticuerpo DVD de longitud completa (1024L992), el IGHV e IGKV de 1024 está en posición N terminal, seguido por el enlazador y el IGHV e IGKV de 992, respectivamente. El ADN plasmídico que codifica el anticuerpo 992 y 1024 se usó como molde para una construcción mediada por PCR de dos etapas de los genes que codifican el DVD. Las regiones que codifican los dos dominios variables de IGHV e IGKV se amplifican primero por separado de tal manera que contienen regiones de extensión solapante en la posición de la región que codifica el enlazador (para combinaciones de moldes y cebadores véanse las Tablas 13 y 14). El gen IGKV que codifica el dominio variable proximal de extremo C se amplificó de tal manera que el gen que codifica el dominio constante de la cadena ligera humana (IGKC) se incluyó en la secuencia codificante. En el Anexo 3 se muestran las secuencias codificantes y las secuencias de aminoácidos de las subunidades de los anticuerpos con dos dominios variables.

La primera PCR se preparó con la siguiente mezcla en cada tubo (reacciones de 50 µl) para obtener la concentración final determinada: 1x tampón FastStart (Roche), mezcla de dNTP (200 µM de cada uno), cebadores (10 pmol de cada uno) (véase la Tabla 14), Combinación de Enzima de Alta Fidelidad FastStart (2,2 U; Roche) y molde plasmídico 100 ng (véase la Tabla 14). La PCR se sometió al siguiente termociclado: 2 min a 95 °C, 20 x (30 s a 95 °C, 30 s a 55 °C, 1 min a 72 °C), 10 min a 72 °C. Los productos resultantes de la PCR con el tamaño correcto de la primera reacción PCR (véase la Tabla 14) se purificaron mediante electroforesis preparativa en gel de agarosa y se usaron en una segunda etapa en la que los dos dominios variables se cortaron y empalmaron mediante PCR de extensión solapante. La segunda PCR, de corte y empalme de fragmentos de ADN mediante PCR de extensión solapante, se preparó con la siguiente mezcla en cada tubo (reacciones de 50 µl) para obtener la concentración final determinada: 1x tampón FastStart (Roche), mezcla de dNTP (200 µM de cada uno), cebadores (10 pmol de cada uno, véase la Tabla 15), Combinación de Enzima de Alta Fidelidad FastStart (2,2 U; Roche) y molde (fragmento de PCR de 100 ng, véase la Tabla 15). La PCR se sometió al termociclado definido anteriormente. Los productos resultantes de la segunda etapa de la PCR se purificaron mediante electroforesis preparativa en gel de agarosa y se trataron con las enzimas de restricción, *AscI* y *XhoI* para el IGHV doble y con *NheI* y *NotI* para el IGKV doble (IGKC incluido). Los fragmentos se ligaron consecutivamente en un vector de expresión de IgG de mamífero, 00-VP-002 (Figura 4), mediante procedimientos convencionales de ligamiento y digestión con enzimas de restricción. El vector de expresión plasmídico resultante se amplificó en *E. coli* y la preparación del plásmido se purificó mediante medios convencionales. Los anticuerpos DVD se expresaron y purificaron como se indica en el Ejemplo 2 y se caracterizaron en cuanto a su actividad como se indica en los ejemplos 3-13.

Si los anticuerpos resultantes muestran unión reducida o no muestran unión con el hEGFr diana pueden ensayarse otros enlazadores.

Tabla 13 Cebadores para construir anticuerpos DVD de 992 y 1024

SEQ NO	ID	Nombre del cebador	Secuencia
121		3'JH	GGAGGCGCTCGAGACGGTGACTGAGGTTCCCTTGAC
122		992_5'VH	CCAGCCGGGGCGCGCCGAGGTCCAAGTGCAGCAACCTGGGTCTGAGCTGGTG
123		1024_5'VH	CCAGCCGGGGCGCGCCGAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTG
124		992_5'VK	catgggaatagctagccGACATTCAGATGACTCAGACTACATCCTCCCTG
125		1024_5'VK	catgggaatagctagccGACATCGTGATGACACAAGCTGCATTCTCCAATC
126		Kappa3'	ACCGCCTCCACCGGCGGCCGCTTATTAACACTCTCCCCTGTTG
127		992H_O3'	CTGGGGGCCCTTGGTGCTGGCTGACGAGACGGTGACTGAGGTTG
128		1024H_O5'	GCCAGCACCAAGGGCCCCCAGGTCCAAGTGCAGCAGC

ES 2 582 386 T3

SEQ NO	ID	Nombre del cebador	Secuencia
129		1024H_O3'	CGGGGCCCTTGGTGCTGGCTGACGAGACGGTGACTGAG
130		992H_O5'	GCCAGCACCAAGGGCCCCGAGGTCCAAGTGCAGCAAC
131		992K_O3'	GTCTGGTGCAGCCACAGTTCGTTTGATTCCAGCTTGGTG
132		1024K_O5'	CGAACTGTGGCTGCACCAGACATCGTGATGACACAAGC
133		1024K_O3'	GTCTGGTGCAGCCACAGTTCGTTTATTCCAGCTTGGTCC
134		992K_O5'	CGAACTGTGGCTGCACCAGACATTCAGATGACTCAGACTAC

Tabla 14 Combinaciones de cebadores y moldes para la 1ª etapa de la PCR para construir genes que codifican DVD de 992 y 1024

DVD	Moldes para la PCR	Cebadores para la amplificación del gen IGHV		Cebadores para la amplificación del gen IGKV	
		1ª etapa de PCR	1 ^{er} producto de PCR (tamaño en pb)	1ª etapa de PCR	1 ^{er} producto de PCR (tamaño en pb)
992L1024	992	992_5'VH 92H_O3'	992HO (406 pb)	992_5'VK 992K_O3'	992KO (359 pb)
	1024	1024H_O5' 3'JH	HO1024 (381 pb)	1024K_O5' Kappa3'	KO1024* (702 pb)
1024L992	992	992H_O5' 3'JH	HO992 (393 pb)	992K_O5' Kappa3'	KO992 (687 pb)
	1024	1024_5'VH 1024H_O3'	1024HO (392 pb)	1024_5'VK 1024K_O3'	1024KO* (374 pb)

*La secuencia codificante amplificada incluye el gen IGKC

5

Tabla 15 Combinaciones de cebadores y moldes para la 2ª etapa de la PCR, corte y empalme mediante extensión solapante, para construir genes que codifican DVD de 992 y 1024

DVD	IGHV			IGKV		
	Moldes	Cebadores	Producto (pb)	Moldes	Cebadores	Producto (pb)
992L1024	992HO HO1024	992_5'VH 3'JH	766	992KO KO1024	992_5'VK Kappa3'	1040
1024L992	HO992 1024HO	1024_5'VH 3'JH	766	KO992 1024KO	1024_5'VK Kappa3'	1040

Ejemplo 20: *Estudio de toxicidad en monos Cinomolgos, después de una administración intravenosa durante 6 semanas, en combinación con Erbitux.*

Objetivo del estudio: el objetivo del estudio era determinar la toxicidad del artículo de ensayo, 992+1024, después de administración intravenosa, una vez a la semana, durante 6 semanas, en monos Cinomolgos.

Dado que la toxicidad es un factor limitante de la dosis en la práctica clínica con inhibidores de EGFR como Erbitux y Vectibix, se consideró importante evaluar, en una fase temprana, la tolerabilidad de 992+1024 a dosis clínicamente relevantes. Se hizo hincapié en esto por el hecho de que 992+1024 parece actuar mediante un mecanismo diferente en comparación con los otros productos que se dirigen a EGFR. Posiblemente, esto podría conducir a nuevos efectos adversos o a un empeoramiento de los efectos observados con otros inhibidores de EGFR.

Se trataron grupos de tres monos cinomolgos hembra con dosis semanales intravenosas (IV) de 992+1024 a 4/2,7 y a 12/8 mg/kg y 12/8 mg/kg de Erbitux durante 6 semanas. Siendo las primeras dosis de 4 y 12 mg/kg dosis de carga y administrándose 5 veces las dosis de mantenimiento de 2,7 y 8 mg/kg. La dosis de 12/8 mg/kg es equivalente a la dosis clínica humana de Erbitux administrada en la práctica clínica.

Diseño del estudio

Número de grupo	Descripción del grupo	Nivel de la dosis (mg/kg/día)	Volumen de la dosis (ml/kg)	Número de animales Hembras
1	Control	0	19 / 12#	1-3
2	992+1024 dosis Baja	4,2 / 2,7#	19 / 12#	4-6
3	992+1024 dosis Alta	12,6 / 8#	19 / 12#	7-9
4	Erbitux	12,6 / 8#	19 / 12#	10-12

El primer nivel de dosis es para la dosis de carga, el segundo nivel de dosis es para la administración desde el Día 8 en adelante

Durante el estudio se siguieron los siguientes parámetros: mortalidad, síntomas clínicos, pesos corporales, consumo de alimento, hematología, química clínica, pesos de los órganos, hallazgos macroscópicos.

Resultados

Mortalidad: a lo largo del estudio no hubo muertes que no estuviesen programadas.

Síntomas clínicos: ningún tratamiento se relacionó con observaciones clínicas adversas

Pesos corporales: no hubo ningún efecto del tratamiento con ninguno de 992+1024 ni Erbitux en el peso corporal.

Consumo de alimento: no hubo efectos notorios sobre el consumo de alimento.

Hematología: no hubo efectos sobre los parámetros hematológicos que sugiriesen un efecto del tratamiento con ninguno de 992+1024 ni Erbitux.

Química clínica: no hubo cambios en los parámetros de la química clínica que sugiriesen un efecto del tratamiento con ningún artículo de ensayo.

A la Semana 4, un animal que recibió una dosis de 4,2/2,7 mg/kg de 992+1024/día mostró niveles aumentados de aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa, en comparación con los valores previos al tratamiento. Estos niveles retornaron a intervalos normales a la semana 6. En ausencia de un efecto similar en otros animales tratados, el significado toxicológico de este aumento en las enzimas hepáticas se desconoce.

Pesos de los órganos: no hubo diferencias de significado toxicológico en los pesos de los órganos entre los animales tratados y los de control.

Hallazgos macroscópicos: no se advirtieron observaciones consistentes en la necropsia que sugiriesen un efecto de 992+1024 o Erbitux.

Conclusión preliminar: los datos preliminares muestran que 992+1024 se toleró bien a las dosis ensayadas y no se observaron efectos adversos relacionados con el tratamiento.

Ejemplo 21. Inhibición del crecimiento de líneas de cáncer de células de pulmón.

Se sabe que las líneas de células de cáncer de pulmón expresan EGFR con mutaciones en el dominio de tirosina quinasa (Steiner *et al* Clin Cancer Res 13.5 (2007): 1540-1551). Mediante un método similar a uno usado en el ejemplo 6, se investigó la capacidad de una combinación de los dos anticuerpos 992 y 1024 para inhibir el crecimiento de las líneas de células de cáncer de pulmón HCC827 y H1975, que tenían diferentes mutaciones en EGFR.

Resultados

Como puede observarse en las Tablas 16 y 17, la combinación de 992 y 1024 puede inhibir el crecimiento de ambas líneas celulares. La combinación es superior a la de los anticuerpos monoclonales 992 y 1024 y a Vectibix.

Tabla 16 Valores de CI50 e inhibición máxima de crecimiento de los anticuerpos indicados frente a la línea celular HCC827

HCC827	CI50 (µg/ml)	Inhibición máx.
Erbix	0,013	80 %
Vectibix	0,100	60 %
992	0,050	80 %
1024	0,034	40 %
992+1024	0,031	80 %

Tabla 17 Valores de CI50 e inhibición máxima de crecimiento de los anticuerpos indicados frente a la línea celular H1975

H1975	CI50 (µg/ml)	Inhibición máx.
Erbix	0,010	30 %
Vectibix	0,141	30 %
992	0,056	30 %
1024	-	0 %
992+1024	0,024	30 %

Anexo 1. Secuencias de la región variable de los anticuerpos

>992VH (Seq. no. 24)

cgcgccgaggtccaactgcagcaacctgggtctgagctgggtgaggcctggagcttcagtgaaagctgtcct
gcaaggcttctggctacacattcaccagctactggatgcactgggtgaagcagaggcctggacaaggcct
tgagtggattgggaatatttatcctggtagtgcgtagtaactacgatgagaagttcaagagcaaggcc
aactgactgtagacacatcctccagcacagcctacatgcagctcagcagcctgacatctgaggactctg
cggctctattactgtacaagaaatggggattactacgttagtagcggggatgctatggactactggggtca
aggaacctcagtcaccgtctcg

>1024VH (Seq. no. 25)

cgcgcccaggtccaactgcagcagcctggggctgaactgggtggagcctgggggttcagtgaaagctgtcct
gcaaggcttctggctacacctcaccagctactggatgcactgggtgaagcagaggcctggacaaggcct
tgagtggataggtgagattaatcctagcagcggctcgttaataactacaatgagaagttcaagagtaaggcc
aactgactgtagacaaatcctccagcacagcctacatgcaattcagcagcctgacatctgaggactctg
cggctctattattgtgtaagatactatgggttacgacgaagctatggactactggggtcaaggaacctcagt
caccgtctcg

>1030VH (Seq. no. 26)

cgcgccgaagtgcagctggaggctctggggaggcttagtgaagcctggagggtccctgaaactctcct
gtgcagcctctggattcactttcagtagttatgccctgtcttgggttcgccagactccagagaggaggt
ggagtgggtcgcatccattagtggtggttagcacctactttccagacagtggaagggccgtttcacc
atgtccagagataatgccaggaacatcctgtacctccaaatgagcagctctgaggtctgaggacacggcca
tgtattactgtgcaagaggttctgatggttactttctatgctatggactactggggtcaaggaacctcagt
cacctctcg

>1042VH (Seq. no. 27)

cgcgcccaggtgcagcttcagcagcctggggctgaactggtgaagcctggggcttcagtgaagctgtcct
gtaaggcttctggctacaccttcaccagccactggatgcaactgggtgcagcagaggcctggacaaggcct
tgagtggattggagagattcatcctagcaacggctcgtactaactacaatgagaagttcaagaacaaggcc
acactgactgtagacaaatctcccagcacagcctacatgcaactcagcagtttgacatctgaggactctg
cggcttattactgtgcaagatactatggttacgacgatgctatggactactggggtcaaggaacctcagt
cacctctcg

5

>1208VH (Seq. no. 28)

cgcgccgaagtgcagctggaggctctggggaggcttagtgaagcctggagggtccctgaaactctcct
gtgcagcctctggattcgtttcagtagctatgacatgtcttgggttcgccagactccggagaagaggct
ggagtgggtcgcatatctggtagtggtgatgataatacccactatccagactctgtgaagggccgatcc
accatctccagacacaatgccaaaaacacctatacctgcaaatgagcagctctgaagctctgaggacacag
ccatgtattactgtgcaagacagaagtatggttaactacggggacactatggactactggggtcaaggaac
ctcagtcaccgtctcg

>1229VH (Seq. no. 29)

cgcgcccaggttcagctgaaggagtcaggacctggcctgggtggcgccctcacagagcctgtccatcactt
gctctgtctctgggtttttcattaaccatctatgggtgtacactgggttcgccagcctccaggaaagggtct
ggagtgggtcgcatatctggtagtggtgatgataatacccactatccagactctgtgaagggccgatcc
accatctccagacacaatgccaaaaacacctatacctgcaaatgagcagctctgaagctctgaggacacag
ccatgtattactgtgcaagacagaagtatggttaactacggggacactatggactactggggtcaaggaac
ctcagtcaccgtctcg

10

>1254VH (Seq. no. 30)

cgcgccgaagtgcagctggaggctctggggaggcttagtgaagcctggagggtccctgaaactctcct
gtgcagcctctggattcgtttcagtagctatgacatgtcttgggttcgccagactccggagaagaggct
ggagtgggtcgcatatctggtagtggtgatgataatacccactatccagactctgtgaagggccgatcc
accatctccagagacaatgccaaaaacacctatacctgcaaatgagcagctctgaagctctgaggacacag
ccatgtattactgtgcaagaggtctcgctatggaaactacggggacgctatggactactggggtcaaggaac
ctcagtcaccgtctcg

15

>1257VH (Seq. no. 31)

cgcgccgaggtccagctgcaacagctctggacctgagctggtgaaacctggggcttcagtgaagataacct
gcaagacttctggatacactttcactgactacaacatggcctgggtgaagcagagccatggaaagagcct
tgagtggattggagatattatcttaacaatggtggtgctatctacaaccagaaattcaagggcaaggcc
actttgactgtagacaaatcctccagtagcagcctccatggagctccgcagcctgacatctgaggacactg
cagctctatttctgtgcaagaaagaatatctactataggtacgacggggcaggtgctctggactactgggg
tcaaggaacctcagtcaccgtctcg

>1260VH (Seq. no. 32)

cgcgcccaggtgcagctgaaggagtcaggacctggcctgggtggcgccctcacagagcctgtccatcactt
gcaactgtctctgggtttttcattaaccacctatggggtacactgggttcgccagcctccaggaaagggtct
ggagtgggtgggagtaatatgggctggtggaagcacaataataattcggctctctatgtccagactgagc
atcaagaaagacaactccaagagccaagttttcttaaaaaatgaacagctctgcaaaactgatgacacagcca
tgtactactgtgccagagcctatggttacaactttgactattggggccaaggcaccactctcacagctctc
g

20

>1261VH (Seq. no. 33)

cgcgccgaagtgacagctggaggctctgggggagggcttagtgaagcctggagggctccctgaaactctcct
 gtgcagctctctggattcactttcagtagctatgtcatgtcttgggttcgccagactccggagaagaggct
 ggagtgggctcgcaaccattactagtggtggtaggaacatctactatctagacagtggtgaagggcgattc
 actatctccagagacaatgccaaagaacacctgtacctgcaaatgagcagctctgaggtctgaggacacgg
 ccatgtattactgtgcaagacatgaggactataggtacgacggttactatgctatggactactggggctca
 aggaacctcagtcacccgtctcg

>1277VH (Seq. no. 34)

cgcgccgaagtgacagctggaggctctgggggagggcttagtgaagcctggagagtccttgaaactctcct
 gtgcagcctctggattcgcctttcagttactctgacatgtcttgggttcgccagactccggagaagaggct
 ggagtgggctcgcaatacatgagtagtgctggtagtcaccttctattcagacactgtgaagggccgattc
 accatctccagagacaatgccaaagaacacctgtatctgcaagtgagcagctctgaagtctgaggacacag
 ccatatattactgtgtaagacacccgggacgtggctatggactactggggctcaaggaacctcagtcacccg
 ctcg

5

>1284VH (Seq. no. 35)

cgcgcccaggtccaactgcagcagcctggggctgaactggggaagcctggggcttcagtgaaagctgtcct
 gcaaggcttctggctacaccttcaccagcactggatgcactggatgaaacagaggcctggacaaggcct
 tgagtggttgagagattaatcctagtaacggctcgtctagctacaatgagaagttcaagagcaaggcc
 aactgactgtagacaaatcctccagcacagcctacatgcaactcagcagcctgacatctgaggactctg
 cggctctattactgtgcaagaataggtggatctacgtggagacttactggggccaagggactctgggtcac
 tgtctcg

10 >1308VH (Seq. no. 36)

cgcgccgaggtccagcttcagcagctctggagctgagctgggtagggcctgggtcctcagtgaaagatttct
 gcaaggcttctggctatgcattcagtagctactggatgaactgggtgagggcagaggcctggacaaggctct
 tgagtggttgagacagatttatcctggagatggtagataactacaatggaaagttcaagggtagagcc
 aactgactgtgcaaaacaaatcctccagcacagcctacatgcaactcagcagcctaacatctgaggactctg
 cggctctatttctgtgcaagaagggcatcttccctctatgatgtttaccctactactttgactactgggg
 ccaaggcaccactctcacagtctcg

15 >1344VH (Seq. no. 38)

cgcgcccaggtgcagctgaaggagtcaggacctggcctgggtagggcctccagagcctgtccatcactt
 gcaactgtctctgggtttcattaaccatctatgggtgtacactgggttcgccagcctccaggaaagggtct
 ggagtggtctgggagtaatatgggctggggaacacaaattataattcggctctcatgtccagactgagc
 atcagcaaagacaactccaagagtcaggttttcttaaaaatgaacagctctgcaactgatgacacagcca
 tgtacttctgtgccagaggctatggctacaatttagactattggggccaaggcaccactctcacagtctc
 g

20 >1347VH (Seq. no. 39)

cgcgcccaggtgcagctgaaggagtcaggacctggcctgggtagggcctccagagcctgtccatcacat
 gcaccgtctcaggattctcattaaccggccatgggtgtaaaactgggttcgccagcctccaggaaagggtct
 ggagtggtctgggaatgatatggggtagtggaagcaggaactataattcaactctcaaatccagactgagt
 atcagcaaggacaactccaagagccaagttttcttaaaaatgaacagctctgcagactgatgacaccgcca
 ggtactactgtgccagaggctacggctacctttactactttgactactggggccaaggcaccactctcac
 agtctcg

>992VH (Seq. no. 40)

RAEVQLQQPGAELVLRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGNIYPGSRST
 NYDEKFKSKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYICTRNGDYVSSGDAMDYWGQGTSTVTS

>1024VH (Seq. no. 41)

RAQVQLQQPGAELVEPPGGSVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPSSGRN
 NYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQFSSLTSEDSAVYYCVRYGYDEAMDYWGQGTSTVTS

5

>1030VH (Seq. no. 42)

RAEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYALSWVRQTPERRLEWVASISGVGSTY
 FPDVSKGRFTMSRDNARNILYLQMSLRSSEDTAMYYCARGSDGYFYAMDYWGQGTSTVTS

10

>1042VH (Seq. no. 43)

RAQVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSHWMHWVQQRPGQGLEWIGEIHPSNGRT
 NYNEKFKNKATLTVDKSPSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYGYDDAMDYWGQGTSTVTS

>1208VH (Seq. no. 44)

RAEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFASFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVAYIGSGDDNT
 HYPDSVKGRFTISRHNKNTLYLQMSLRSSEDTAMYYCARQKYGNYGDTMDYWGQGTSTVTS

15

>1229VH (Seq. no. 45)

RAQVQLKESGPGGLVAPSQSLISITCSVSGFSLTIYGVHWVRQPPGKGLEWLGVMWAGGNTD
 YNSALMSRLNISKDNSKQVFLKVNLSLQDDTAMYYCTRDPDGYVGVWFFDVWGAGTTVT
 VS

>1254VH (Seq. no. 46)

RAEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAYSTYDMSWVRQTPEKRLEWVAYISSGGDAA
 YPDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRSSEDTAMYYCARSRYGNYGDMAMDYWGQGTSTVTS

20

>1257VH (Seq. no. 47)

RAEVQLQQSGPELVKPGASVKIPCKTSGYTFTDYNMAWVKQSHGKSLEWIGDIIPNNGGA
 IYNQKFKGKATLTVDKSSSTASMELRSLTSEDTAVYFCARKNIYYRYDGAGALDYWGQGT
 STVTS

25

>1260VH (Seq. no. 48)

RAQVQLKESGPGGLVAPSQSLISITCTVSGFSLTTYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGSTN
 YNSALMSRLSIKKDNSKQVFLKMNSLQDDTAMYYCARAYGYNFDYWGQGTTLTTS

>1261VH (Seq. no. 49)

RAEVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAVSGFTFSSYVMSWVRQTPEKRLEWVATITSGGRNI
 YYLDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRSSEDTAMYYCARHEDYRYDGYAMDYWGQGTSTVTS

30

>1277VH (Seq. no. 50)

RAEVQLVESGGGLVKPGESLKLSCAASGFASFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVAYMSSAGDVT
 FYSDTVKGRFTISRDNKNTLYLQVSSLKSEDTAIYYCVRHRDVAMDYWGQGTSTVTS

>1284VH (Seq. no. 51)

RAQVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSDWMHWKQRPGQGLEWIGEINPSNGRS
 SYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARIGGIYVETYWGQGTTLTTS

35

>1308VH (Seq. no. 52)

RAEVQLQQSGAELVLRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNVWRQRPGQGLEWIGQIYPGDGDT
 NYNGKFKGRATLTANKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARRASSLYDVYPYFDYWGQGT
 TLTTS

>1320VH (Seq. no. 53)

RAQVQLQQPGAELVKPGASMKLSCKASGYFTFTNYWMHWKQRPQGLEWIGEINPSNGRT
NYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSGVYYCAKGGNYYDYDWDYWGQTTTLTV
S

>1344VH (Seq. no. 54)

RAQVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTIYGVHWVRQPPGKLEWLGVIWAGGNTN
YNSALMSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDETAMYFCARGYGYNLDYWGQTTTLTVS

5

>1347VH (Seq. no. 55)

RAQVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTGHGVNWRQPPGKLEWLGMIWGDGSTD
YNSTLKSRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDETARYYFCARGYGYLYYFDYWGQTTTLTVS

10 >992VL (Seq. no. 56)

ctagccgacattcagatgactcagactacatcctcctctgctctctctgggagacagagtcaccatca
gttgccaggacaagtcaggacattggcaattattttaaactgggtatcagcagaaaaccagatggaactgttaa
actcctgatctactacacatcaagattacactcaggagtcaccatcaagggtcagtgccagtggtctgga
acagatttttctctcaccattaacaacgtggagcaagaggatggtgccacttacttttgccaactata
atacgggttccctccgacgttcgggtggaggcaccagctggaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgt
cttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataac
ttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataaacgccctccaatcgggtaactcccaggaga
gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaaagcaga
ctacgagaaacacaaagtctacgctcgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagc
ttcaacaggggagagtggt

>1024VL (Seq. no. 57)

ctagccgacatcgtgatgacacaagctgcattctccaatccagtcactcttggaaacatcagcttccatct
cctgcagggtctagtaagagtctcctacatagtaatggcatcacttatttgtattgggtatctgcagaagcc
aggccaggtctcctcagctcctgatttatcagatgtccaaccttgectcaggagtcaccagacaggttcagt
agcagtggtcaggaactgatttcacactgagaatcagcagagtgagggtgaggatgtgggtgtttatt
actgtgctcaaaatctagaacttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggaaataaaacgaactgt
ggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtg
tgectgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataaacgccctccaatcgg
gtaactcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgac
gctgagcaaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgctcgcgaagtcacccatcagggcctgagctcg
cccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtggt

15

>1030VL (Seq. no. 58)

ctagccgacattgtgctgactcagctctcctgcttcttagctgtatctctggggcagagggccaccattt
catgcagggccagcaaaagtgtcagtaacatctggctatagttttatgactgggtaccaactgaaaccagg
acagccacccaaactcctcatctatcttgcatccaacotagaatctgggtccctgccaggttcagtgcc
agtgggtctgggacagacttaccctcaacatccatcctgtggaagaggaggatgctgcaacctattact
gtcagcacagtagggagtttccgttaacgttcggaggggggaccaagctggaaataaaacgaactgtggc
tgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgc
ctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataaacgccctccaatcgggta
actcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgct
gagcaaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgctcgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccc

gtcacaaagagcttcaacaggggagagtggt

>1042VL (Seq. no. 59)

gatattgtgatgactcaggctgcattctccaatccagtcactcttggaaacatcagcttccatctcctgca
 ggtctagtaagagtctcctacatagtaatggcatcacttatttggatctgcagaagccaggcca
 gtctcctcagctcctgatttatcagatgtccaaccttgcctcaggagtcccagacaggttcagtagcagt
 gggcaagaactgatttcacactgagaatcagcagagtggaggctgaggatgtgggtgtttactgtg
 ctcaaaatctagaacttccgtacacgttcggagggggaccaagctggaaataaaacgaactgtggctgc
 accatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaaactgectctgttgtgtgctg
 ctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaact
 cccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgag
 caaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccgctc
 acaagagcttcaacaggggagagtgt

>1208VL (Seq. no. 60)

ctagccgatggtgtgatgactcagactccactctcctgctcagtccttggagatcaagcctccatct
 cttgcagatctagtccagagccttgtacacagtaatggaaacacctatttacattggtacctgcagaagcc
 aggcagctctccaaaactcctgatctacaaagtttccaaccgattttctggggctcccagacaggttcagt
 ggcagtggtcagggacagatttcacactcaagatcagcagagtggaggctgaggatctgggagtttatt
 tctgctctcaaaagtacacatgttcccacgttcggagggggaccaagctggaaataaaacgaactgtggc
 tgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaaactgectctgttgtgtgc
 ctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggta
 actcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgct
 gagcaaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccc
 gtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt

5

>1229VL (Seq. no. 61)

ctagccgacattgtgatgacccagctctcaaaaattcatgtccacatcagtgaggagacagggctcagcatca
 cctgcaaggccagtcaggatgtgactaatgcccgtagcctgggtatcaacaaaaaccaggacaatctcctaa
 actactgatttactgggcatccatccgacacactggagtcctctgatcgcttccacagggcagtagatctggg
 acagattatactctcaccatcaacagtggtgcaggtgaagacctggccctttattattgtcagcaacatt
 ataacactccgctcagcttcgggtgctgggaccaagctggaaataaaacgaactgtggctgcaccatctgt
 ctctcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaaactgectctgttgtgtgctgctgaataac
 ttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggaga
 gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaaagcaga
 ctacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagc
 tcaacaggggagagtgt

10 >1254VL (Seq. no. 62)

ctagccgatggtgtgatgacacagactccactctcctgctcagtccttggagatcaagcctccatct
 cttgcagatctagtccagagccttgtacacagtaatggtaaacacctatttacattggtacctgcagaagcc
 aggcagctctccaaagctcctgctctacaaagtttccaaccgattttctggggctcccagacaggttcagt
 ggcagtggtcagggacagatttcacactcaagatcagcagagtggagtctgaggatctgggagtttatt
 tctgctctcaaaatacacatgtgtacacgttcggaggggggacaaagttggaaataaaacgaactgtggc
 tgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaaactgectctgttgtgtgc
 ctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggta
 actcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgct
 gagcaaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccc
 gtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt

>1257VL (Seq. no. 63)

ctagcccaaatgtgctcacacagttctccagcaatcatgtctgcatctccaggggagaagggtcaccatga
 cctgcagtgccagctcaagtgttaagttacatttactggtagcagcagaagccaggatcctccccagact
 cctgatttatgacgcacccaacctggcttctggagtcctgttcgcttcagtgccagtggttctgggacc
 tcttactctctcacaatcagccgaatggaggctgaagatgctgccacttattactgccagcagtgaggca
 gttaccaatcacggttcggctcggggacaaagttggaaataaaaogaactgtggctgcaccatctgtctt
 catcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttc
 tatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagt
 tcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagacta

cgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagcttc
 aacaggggagagtgt

>1260VL (Seq. no. 64)

ctagccgatatccagatgactcagactacatcctcctgtctgctctctgggagacagagtcaccatca
 gttgcagtgcaagtcagggcattaccaattatttaaactggtagcagcagaaccagatggaaactgttaa
 actcctgatctattactcatcaagtttacactcaggagtcacatcaaggttcagtgccagtggttctggg
 acagattattctctcaccatcagcaacctggaacctgaagatattgccacttactattgtcagcagata
 gtgagattccgtacacggttcggaggggggaccaagctggagctgaaacogaactgtggctgcaccatctgt
 ctcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataac
 ttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggaga
 gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcaga
 ctacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagc
 ttcaacaggggagagtgt

5

>1261VL (Seq. no. 65)

ctagcccaaatgtgctgaccagttctccagcaatcatgtctgcatctccaggggagaagggtcaccataa
 cctgcagtgccagctcaagtgttaagttacatgcaactggtagcagcagaagccaggcacttctcccaact
 ctggatttatagtagcatccaacctggcttctggagtcctgttcgcttcagtgccagtggttctgggacc
 tcttactctctcacaatcagccgaatggaggctgaagatgctgccacttattactgccagcaaggagta
 gttaccaatacacggttcggaggggggaccaagctggagctgaaacogaactgtggctgcaccatctgtctt
 catcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttc
 tatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagt
 tcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcagacta
 cgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaagagcttc
 aacaggggagagtgt

10

>1277VL (Seq. no. 66)

ctagccgatggtgtgatgaccagactccactctcctgctgtcagttctggagatcaagcctccatct
 cttgcagatctagtcagagccttgtacacagtaatggaaacacctatttacattggtacctgcagaagcc
 agggcagttctccaaagctcctgatctacaaagtttccaaccgattttctggggctccagacaggttcagt
 ggcagtggtatcagggacagatttcacactcaagatcagcagagtgaggctgaggatctgggagtttatt
 tctgctctcaaagtacacatggtccgacggttcggtaggacccaagctggaaatcaaacgaactgtggc
 tgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgc
 ctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggta
 actcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgct
 gagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccc
 gtcacaagagcttcaacaggggagagtgt

>1284VL (Seq. no. 67)

ctagccgacattgtgctaacacagftctcctgcttcccttagctgtatctctggggcagagggccaccatct
 catgcagggccagccaaagtgtcagtaacatctacctatagttatatagcactgggtatcaacagaaatcagg
 acagccaccocaaactcctcatcaagatgcatccaacctagagttctggggtccttgcaggttcagtggc
 agtgggtctgggacagacttcaccctcaacatccatcctgtggaggaggagatactgcaacatattact
 gtcagcacagttgggagattccgtggacgttcgggtggaggcaccgaagctggaaatcaaacgaactgtggc
 tgcaccatctgtcttccatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgc
 ctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaaggtggataaacgcctccaatcgggta
 actcccaggagagtggtcacagagcaggaacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgct
 gagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgogaagtcacccatcagggcctgagctcgccc
 gtcacaaagagcttcaacaggggagagtggt

>1308VL (Seq. no. 68)

ctagccgacatccagatgacacaaactacatcctcctctgctgcctctctgggagacagagtcaccatca
 gttgcagggcaagtcaggacattagcaattatthaaactgggtatcagcagaaaccagatggaactgttaa
 agtccctgatctactacacatcaagattacactcaggagtcoccatcaagggttcagtggcagtggtctgga
 acagattattctctcaccattagcaacctggagcaagaagatattgccacttacttttgccaacagggta
 atacgcttccgtacacggttcggaggggggaccaagctggaaataaaaacgaactgtggctgcaccatctgt
 ctccatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataac
 ttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaaggtggataaacgcctccaatcgggtaactcccaggaga

gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcaga
 ctacgagaaacacaaagtctacgcctgogaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagc
 ttcaacaggggagagtggt

5

>1320VL (Seq. no. 69)

ctagccgacattcagatgacccagactacatcctcctctgctgcctctctgggagacagagtcaccatca
 gttgcagtgcaagtcaggacattagcaattatthaaactgggtatcagcagaaaccagatggaactgttaa
 actcctgatctatcacacatcaactttacactcaggagtcoccatcaagggttcagtggcagtggtctggg
 acagattattctctcaccatcagcaacctggaacctgaagatattgccacttactattgtcagcaatata
 gtaagcttccgtggacgttcgggtggaggcaccgaagctggaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgt
 ctccatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataac
 ttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaaggtggataaacgcctccaatcgggtaactcccaggaga
 gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcaga
 ctacgagaaacacaaagtctacgcctgogaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagc
 ttcaacaggggagagtggt

10 >1344VL (Seq. no. 70)

ctagccgacattcagatgacacagactacttccctcctctgctgcctctctgggagacagagtcaccatta
 gttgcagtgcaagtcaggacattagcaattatthaaactgggtatcagcagaaaccagatggaactgttaa
 actcctgatctattacacatcaagtttacactcaggagtcoccatcaagggttcagtggcagtggtctggg
 acagattattctctcaccatcagcaacctggaacctgaagatattgccacttactattgtcagcagtata
 gtaagcttccgtacacggttcggaggggggaccaagctggaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgt
 ctccatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataac
 ttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaaggtggataaacgcctccaatcgggtaactcccaggaga
 gtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgctgagcaaagcaga
 ctacgagaaacacaaagtctacgcctgogaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagc
 ttcaacaggggagagtggt

ES 2 582 386 T3

>1347VL (Seq. no. 71)

ctagccgaaaatgtgctgaactcagtcctccagcaatcatgtctgcatctccaggggaaaaggcaccatga
cctgcagggccagctcaagtgtaagttccagttacttgcactggtaccagcaaaagtcagggtgctcccc
caaactctggatttatagcacatccaacttggcttctggagtcctgctcgcttcagtggcagtggtct
gggacctcttactctctcacagtcacacagtggtggagactgaagatgctgccacttattactgccaccagt
acagtggtttcccattcacgcttcggctcggggaccaagctggagctgaaacgaactgtggtgcaccatc
tgtcttcactctcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgctgctgaat
aacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaagggtggataacgccctccaatcgggtaactcccagg
agagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaac
agactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgctcacaag
agcttcaacaggggagagtgt

>992VL (Seq. no. 72)

LADIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRTSQDIGNYLNWYQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGV
PSRFGSGSGTDFSLTINNVEQEDVATYFCQHYNTVPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSST
LTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5

>1024VL (Seq. no. 73)

LADIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSN
LASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYCAQNLELPYTFGGGKLEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
LSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10 >1030VL (Seq. no. 74)

LADIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSFMHWYQLKPGQPPKLLIYLASN
ESGVPDRFSSSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSREFPLTFGGGKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1042VL (Seq. no. 75)

DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLA
SGVPDRFSSSGSRTDFTLRISRVEAEDVGVYCAQNLELPYTFGGGKLEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
SSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

15

>1208VL (Seq. no. 76)

LADVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYQLKPGQSPKLLIYKVS
NRFSGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPTFGGGKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1229VL (Seq. no. 77)

LADIVMTQSHKFMSTSVGDRVSI TCKASQDVTNAVAWYQKPGQSPKLLIYWASIRHTGV
PDRFTGSRSGTDYTLTINSVQAEDLALYYCQHYNTPLTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSST
LTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20

>1254VL (Seq. no. 78)

LADVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYQLKPGQSPKLLIYKVS
NRFSGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVESEDLGVYFCSQNTHVYTFGGGKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ES 2 582 386 T3

>1257VL (Seq. no. 79)

LAQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYIYWYQQKPGSSPRLLIYDASNLAGV
VRFSGSGSGTSDYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPITFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTL
TLTKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1260VL (Seq. no. 80)

LADIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQGITNYLNWYQQKPDGTVKLLIYSSSLHSGV
PSRFSGSGSGTSDYSLTISRMEAEEDAATYYCQQYSEIPTYFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFP
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTL
LTLTKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5

>1261VL (Seq. no. 81)

LAQIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLAGV
ARFSGSGSGTSDYSLTISRMEAEEDAATYYCQQRSSYPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTL
TLTKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10 >1277VL (Seq. no. 82)

LADVMTQTPLSLFVSLGDAQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYQKPGQSPKLLIYKVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPTFGGGTKLEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY
SLSSSTLTLTKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1284VL (Seq. no. 83)

LADIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSTYSYMHWYQKSGQPPKLLIKYASNL
ESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYCQHSWEIPTWTFGGGKLEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY
SLSSSTLTLTKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

15

>1308VL (Seq. no. 84)

LADIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKVLIIYTSRHLHSGV
PSRFSGSGSGTSDYSLTISRMEAEEDAATYYCQQGNTLPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTL
LTLTKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>1320VL (Seq. no. 85)

LADIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSTLHSGV
PSRFSGSGSGTSDYSLTISRMEAEEDAATYYCQQYKLPWTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTL
LTLTKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20

>1344VL (Seq. no. 86)

LADIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSSSLHSGV
PSRFSGSGSGTSDYSLTISRMEAEEDAATYYCQQYKLPWTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTL
LTLTKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

25 >1347VL (Seq. no. 87)

LAENVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSSSYLHWYQQKSGASPKLWIYSTSNLAG
VPARFSGSGSGTSDYSLTVNSVETEDAATYYCHQYSGFPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS
TLTKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Anexo 2, secuencias de la región constante de los anticuerpos

>Región de IGKC humana (Seq. no. 88)

ttcatcttccccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgctgctgaataact
 tctatcccagagagggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagag
 tgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagac
 tacgagaaacacaaagtctacgctggaagtacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagct
 tcaacaggggagagtgtaataagcggccgctggaggggt

5

>Región de IGKC humana (Seq. No. 89)

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Exón1 1..298

Intrón 299..689

Exón2 690..734

Intrón 735..852

Exón3 853..1182

Intrón 1183..1279

Exón4 1280..1602

10

15

>secuencia genómica del dominio constante de IGHG1 humano (Seq. no. 90)

agtgcctccaccaagggcccatcggctcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacag
 cggccctgggctgctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgctggtggaactcaggcgcct
 gaccagcggcgtgcacaccttcccggctgctctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggg
 accgtgcctccagcagcttggcaccacagcctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacacca
 aggtggacaagagagttgggtgagaggccagcacagggagggaggggtgtctgctggaagccaggctcagcg
 ctctgctgacgcacccccgctatgcagtcacagtcacagggcagcaaggcaggccccctctgctctt
 caccggaggcctctgccccccccactcatgctcagggagaggggtctctggcttttccccaggctctg
 ggcaggcacaggctaggtgcccccaaccagccctgcacacaaaggggcaggtgctgggctcagacctg
 ccaagagccatatccgggaggaccctgccccctgacctaaagccacccccaaaggccaaactctccactcc
 tcagctcggacacctctctctctccagattccagtaactcccaatctctctctctgagagccccaatct
 tgtgacaaaactcacacatgccaccgctgccaggtaagccagcccaggcctcgccctccagctcaaggc
 gggacaggtgccctagagtgcctgcatccaggacagggcccagccgggtgctgacacgtccacctcca
 tctcttctcagcactgactcctgggggacgctcagctcttctcttcccccaaaaacccaaggacac
 cctcatgatctccggaccctgaggtcacatgctggtggtggaagctgagccacgaagaccctgaggtc
 aagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccggggaggagcagta
 acagcacgtaccgtggtgagcgtctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtaca
 gtgcaaggtctcaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggtgggacc
 cgtggggtgaggggcccacatggacagagggcggcctcggccccaccctctgccccctgagagtgaccgctgta
 ccaacctctgtccctacagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatcccgggaggaga
 tgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagt
 ggagagcaatgggagccgggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctccttc
 ttctctatagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtga
 tgcagtaggctctgcacaaccactacagcagaagagcctctccctgtccccgggtaaatga

20 >IGHG1 (Seq. no. 91)

SASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
 VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTF
 EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
 LDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK

Anexo 3. Secuencias de anticuerpos con dos dominios variables

25

>992L1024\IGHV (Seq. no. 92)

ggcgcgcccagggtccaactgcagcaacctgggtctgagctgggtgaggcctggagcttcagtgaagctgtc
 ctgcaaggcttctggctacacattcaccagctactggatgcaactgggtgaagcagaggcctggacaaggc
 cttgagtggtattgggaatatttatcctggtagtcgtagtaactacgatgagaagttcaagagcaagg
 ccacactgactgtagacacatcctccagcagcctacatgcaattcagcagcctgacatctgaggactc
 tgcggctctattactgtacaagaaatggggattactacgttagtagcggggatgctatggactactgggg
 caaggaacctcagtcaccgtctcgtcagccagcaccaagggccccccagggtccaactgcagcagcctggg
 ctgaaactgggtggagcctgggggttcagtgaagctgtcctgcaaggcttctggctacacctcaccagtca
 ctggatgcaactgggtgaagcagaggcctggacaaggccttgagtggtataggtagattaatcctagcagc
 ggtcgtataactacaatgagaagttcaagagtaaggccacactgactgtagacaaaatcctccagcagc
 cctacatgcaattcagcagcctgacatctgaggactctgcggctctattattgtgtaagatactatgggta
 cgacgaagctatggactactgggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcag

>992L1024\IGKV (Seq. no. 93)

gctagccgacattcagatgactcagactacatcctcctcgtctgcctctctgggagacagagtcaccatc
 agttgcaggacaagtcaggacattggcaattatthaaactgggtatcagcagaaaaccagatggaactgtta
 aactcctgatctactacacatcaagattacactcaggagtcctcctcaagggttcagtgccagtggggtctgg
 aacagattttctctcaccattaacaacgtggagcaagaggatggtgccaacttacttttgccaacactat
 aatacgggttctcctccgacgttcgggtggaggccaagctggaaatcaaacgaactgtggctgcaccagaca
 tcgtgatgacacaagctgcattctccaatccagtcactcttggaaactcagcttccatctcctgcaggctc
 tagtaagagctctcctacatagtaatggcatcacttatttggatctcgcagaagccaggccagctct
 cctcagctcctgatttatcagatgtccaaccttgccctcaggagtcctcagacaggttcagtagcagtggtg
 caggaactgatttcacactgagaatcagcagagtgagggtcaggatgtgggtgtttattactgtgctca
 aatctagaacttccgtacacgttcggaggggggaccaagctggaaataaaacgaactgtggctgcacca
 tctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgggtgctcctgctga
 ataactctatcccagagaggccaaagtcagtggaaggtggataacgcctcctcaatcgggtaactccca
 ggagagtgctcacagagcaggacagcaaggacagcactcagcctcagcagcaccctgacgtgagcaaa
 gcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcctcctcaca
 agacttcaacaggggagagtggttaataagcggcgc

5

>1024L992\IGHV (Seq. no. 94)

ggcgcgcccagggtccaactgcagcagcctggggctgaactgggtggagcctgggggttcagtgaagctgtc
 ctgcaaggcttctggctacacctcaccagtcactggatgcaactgggtgaagcagaggcctggacaaggc
 cttgagtggtataggtagattaatcctagcagcggctcgtataaactacaatgagaagttcaagagtaagg
 ccacactgactgtagacaaaatcctccagcagcctacatgcaattcagcagcctgacatctgaggactc
 tgcggctctattattgtgtaagatactatgggttacgacgaagctatggactactgggtcaaggaacctca
 gtcaccgtctcgtcagccagcaccaagggccccccagggtccaactgcagcaacctgggtctgagctgggtga
 ggctggagcttcagtgaagctgtcctgcaaggcttctggctacacattcaccagctactggatgcaactg
 ggtgaagcagaggcctggacaaggccttgagtggtattgggaatatttatcctggtagtcgtagtaactaac
 tacgatgagaagttcaagagcaaggccacactgactgtagacacatcctccagcagcctacatgacagc
 tcagcagcctgacatctgaggactctgcggctctattactgtacaagaaatggggattactacgttagtag
 cggggatgctatggactactgggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcag

10

>1024L992\IGKV (Seq. no. 95)

gctagccgacatcgtgatgacacaagctgcattctccaatccagtcactcttggaacatcagcttccatc
tccgaggtctagtaagagtctcctacatagtaatggcatcacttatttgtattggtatctgcagaagc
cagccaggtctcctcagctcctgatttatcagatgtccaaccttgccctcaggagtcccagacaggttcag
tagcagtggttcaggaactgatttcacactgagaatcagcagagtggaggctgaggatgtgggtgtttat
tactgtgctcaaaatctagaacttccgtacagcttcggagggggaccaagctggaaataaacgaactg
tggctgcaccagacattcagatgactcagactacatcctcctgtctgcctctctgggagacagagtcac
catcagttgcaggacaagtcaggacattggcaattatttaaactggtatcagcagaaaccagatggaact
gttaaactcctgatctactacacatcaagattacactcaggagtcccatcaaggttcagtggcagtggtt
ctggaacagatttttctctcaccattaacaacgtggagcaagaggatgttgccacttacttttgccaaca
ctataatacggttcctccgacgttcggtggaggaccaagctggaaatcaaacgaactgtggctgcacca
tctgtcttcatcttcccgcctctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgctgctga
ataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcctccaatcgggtaactccca
ggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagaccctgacgctgagcaaa

gcagactacgaaaaacaaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaa
agagcttcaacaggggagagtgttaataagcggccgc

5 >992L1024\IGHV (Seq. no. 96)

RAEVQLQQPGSELVVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGNIYPGSRST
NYDEKFKSKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRNGDYVSSGDAMDYWGQGTS
VTVSSASTKGPQVQLQQPGAELVEPGGSVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQRPGQGLEWIG
EINPSSGRNNYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQFSSLTSEDSAVYYCVRYGYDEAMDYW
GQGTSVTVS

>992L1024\IGKV (Seq. no. 97)

LADIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRTSQDIGNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGV
PSRFGSGSGTDFSLTINNVEQEDVATYFCQHYNTVPPTFGGGTKLEIKRTVAAPDIVMT
QAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPD
RFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGKLEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLT
LSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

>1024L992\IGHV (Seq. no. 98)

RAQVQLQQPGAELVEPGGSVKLSCKASGYTFTSHWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPSSGRN
NYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQFSSLTSEDSAVYYCVRYGYDEAMDYWGQGTSVTVS
SASTKGPVQLQQPGSELVVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGNIYP
GSRSTNYDEKFKSKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRNGDYVSSGDAMDYW
GQGTSVTVS

>1024L992\IGKV (Seq. no. 99)

LADIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSN
LASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGKLEIKRTVAAP
DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRTSQDIGNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDFSLTINNVEQEDVATYFCQHYNTVPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLT
LSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

15

REIVINDICACIONES

1. Una composición de anticuerpos que comprende una primera molécula de anticuerpo contra EGFR humano y una segunda molécula de anticuerpo contra EGFR humano distinta, en la que:
- 5 a) la primera molécula de anticuerpo contra EGFR comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada en la SEQ ID NO: 40 y las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera en la SEQ ID NO: 72; y
- 10 b) la segunda molécula de anticuerpo contra EGFR comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada en la SEQ ID NO: 41 y las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera en la SEQ ID NO: 73.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que:
- 15 a) la primera molécula de anticuerpo contra EGFR comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende los aminoácidos 3 a 109 de la SEQ ID NO: 72 y un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende los aminoácidos 3 a 124 de la SEQ ID NO: 40; y
- 20 b) la segunda molécula de anticuerpo contra EGFR comprende un VL que comprende los aminoácidos 3 a 114 de la SEQ ID NO 73 y un VH que comprende los aminoácidos 3 a 120 de la SEQ ID NO 41.
3. La composición de la reivindicación 2, en la que:
- 25 a) la primera molécula de anticuerpo contra EGFR comprende una cadena pesada que tiene un VH que comprende los aminoácidos 3 a 124 de la SEQ ID NO: 40 y una región constante que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 91, y tiene una cadena ligera que comprende los aminoácidos 3 a 216 de la SEQ ID NO: 72; y
- 30 b) la segunda molécula de anticuerpo contra EGFR comprende una cadena pesada que tiene un VH que comprende los aminoácidos 3 a 120 de la SEQ ID NO: 41 y una región constante que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 91, y tiene una cadena ligera que comprende los aminoácidos 3 a 221 de la SEQ ID NO: 73.
4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la primera y segunda molécula de anticuerpo contra EGFR no inhiben la unión entre sí con el EGFR humano.
5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que al menos una de las moléculas de anticuerpo puede aumentar la capacidad de unión máxima de la otra molécula de anticuerpo con respecto al EGFR humano.
- 35 6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la proporción del primer anticuerpo con respecto al segundo anticuerpo en la composición comprende entre el 5 y el 95 %, entre el 10 y el 90 %, entre el 20 y el 80 %, entre el 30 y el 70 %, entre el 40 y el 60 %, entre el 45 y el 55 % o es de aproximadamente 50 %.
- 40 7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 y 4 a 6, en la que la primera y segunda molécula de anticuerpo son del subtipo isotípico IgG1 o IgG2.
- 45 8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la composición puede conducir a la internalización del receptor EGFR.
9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la composición puede conducir a la regresión de tumores A431 NS *in vivo*.
- 50 10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la composición puede inducir una diferenciación terminal en células A431 NS *in vivo*.
- 55 11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la composición puede regular positivamente la expresión tumoral de la involucrina *in vivo*.
- 60 12. Una molécula de unión biespecífica que se une al EGFR, en la que un primer sitio de unión a un antígeno de la molécula comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada en la SEQ ID NO: 40 y las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera en la SEQ ID NO: 72, y un segundo sitio de unión a un antígeno de la molécula comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada en la SEQ ID NO: 41 y las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera en la SEQ ID NO: 73.
- 65 13. La molécula de unión biespecífica de la reivindicación 12, en la que la molécula de unión biespecífica es un anticuerpo con dos dominios variables, un fragmento Fab biespecífico o un scFv biespecífico.

14. Uso de la composición de anticuerpos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o la molécula de unión biespecífica de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento, mejora o prevención de uno o más síntomas asociados con cáncer en un mamífero.
- 5 15. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o la molécula de unión biespecífica de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, para su uso como medicamento para el tratamiento, mejora o prevención de uno o más síntomas asociados con cáncer en un mamífero.
- 10 16. El uso de la reivindicación 14 o la composición o la molécula de unión biespecífica para el uso de la reivindicación 15, en la que el mamífero es un ser humano.
- 15 17. Una composición farmacéutica que comprende la composición de anticuerpos de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o la molécula de unión biespecífica de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

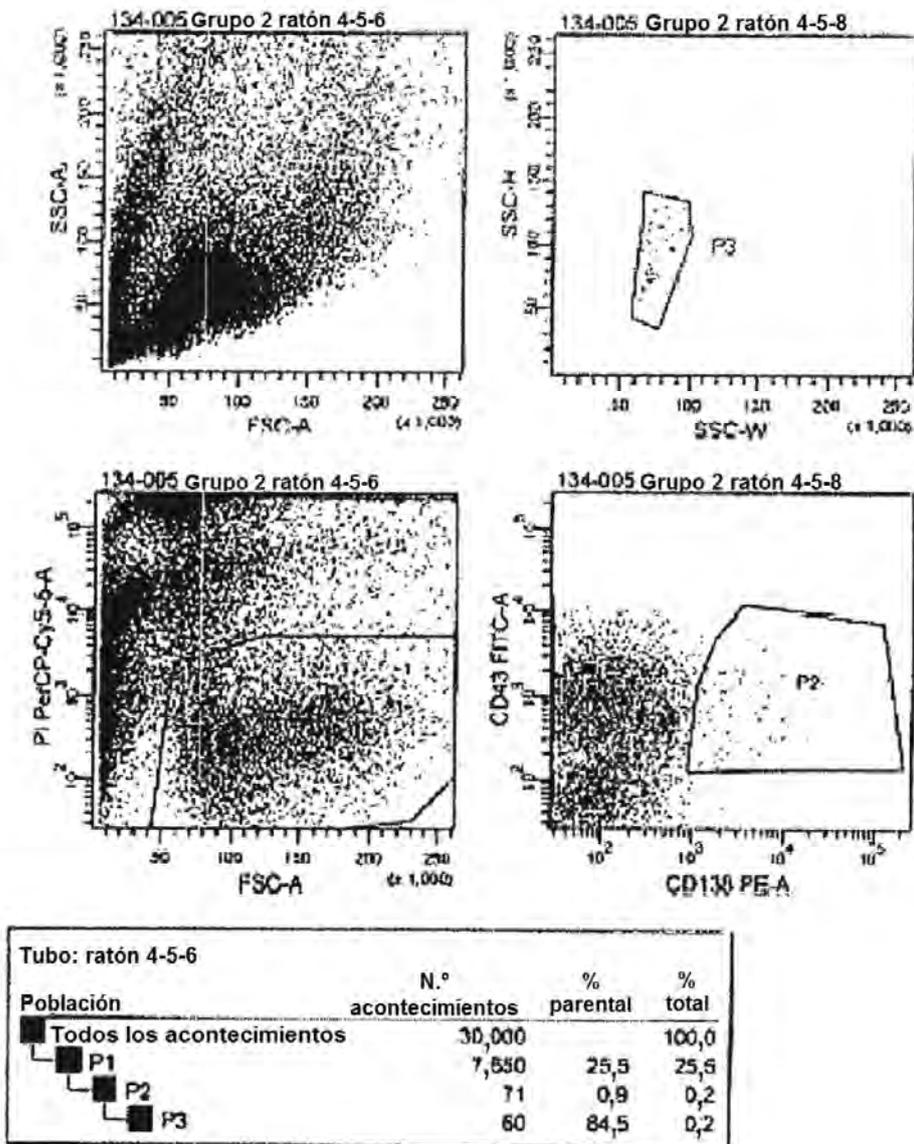


Fig. 1

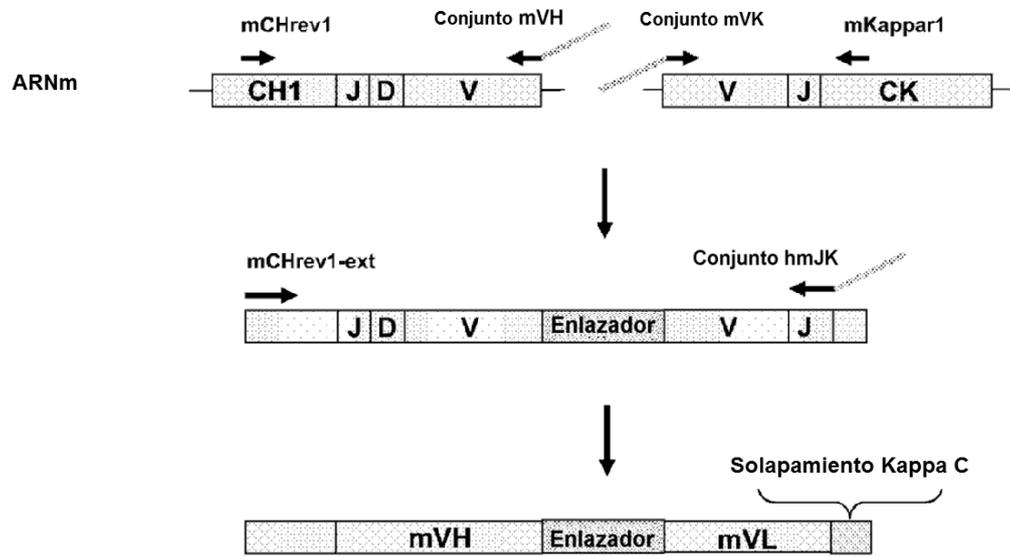


Fig. 2

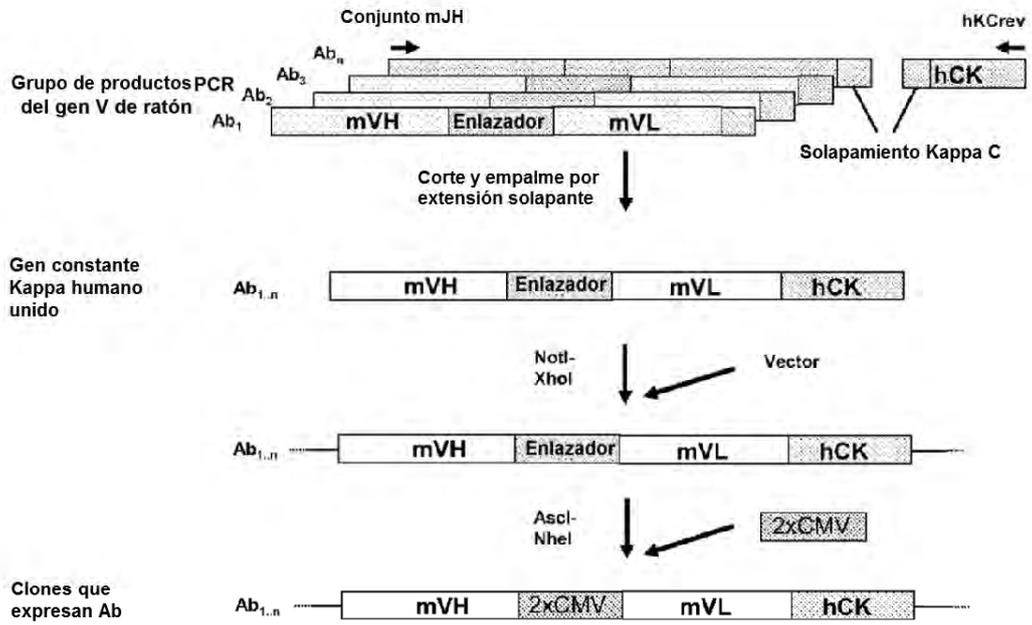


Fig. 3

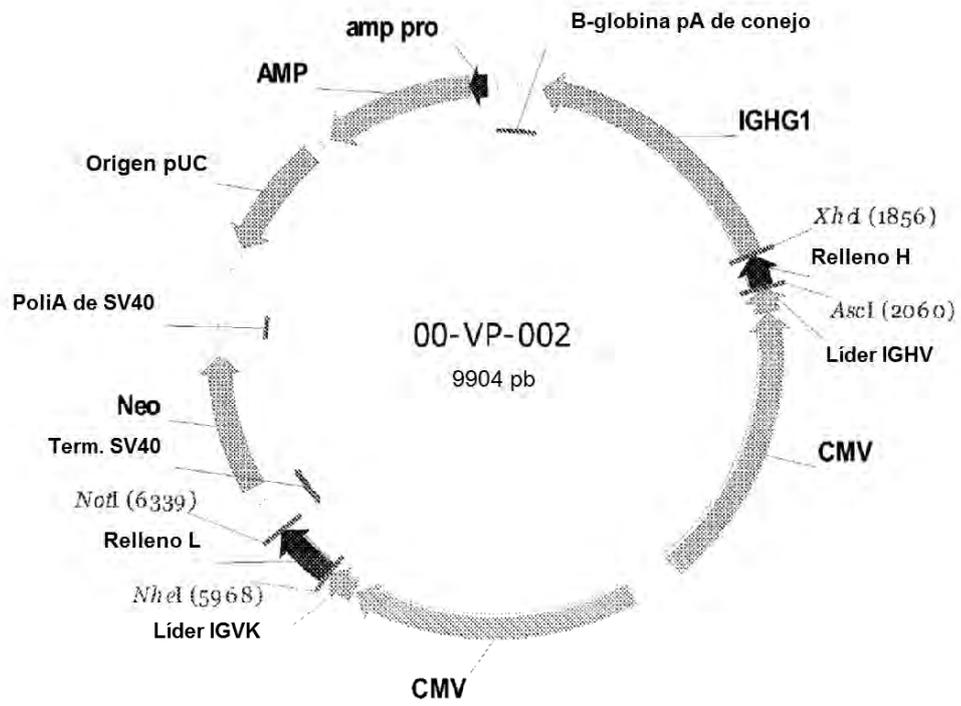


Fig. 4

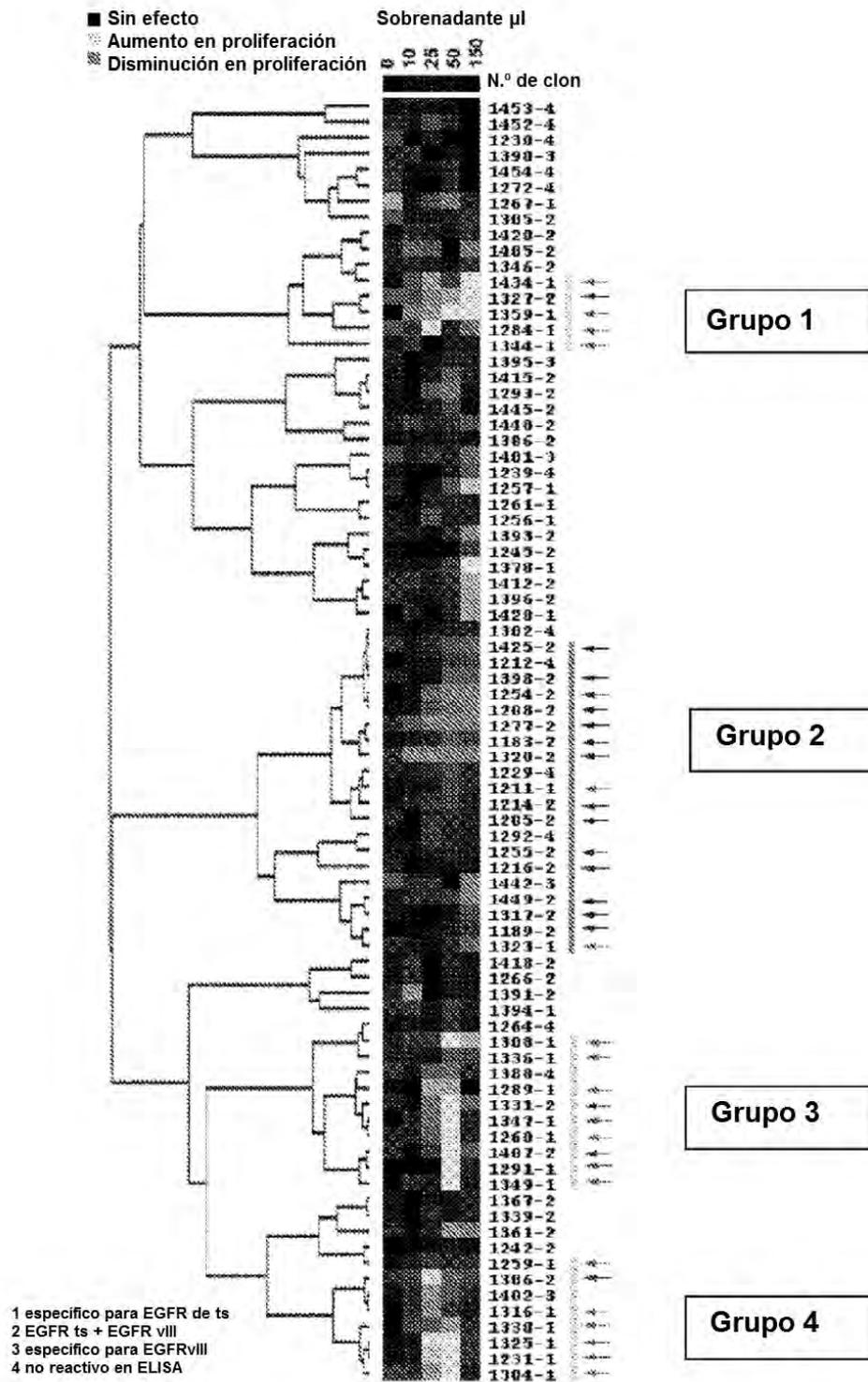


Fig. 5

Clon	I		II	III			
	ICR10	Ab-11	Ab-3	Ab-5	Ab-10	Ab-1	Ab-2
992	-20	-2	-21	-3	-14	78	77
1024	11	18	11	12	27	3	75
1030	12	-20	-35	92	92	94	-1
1042	-7	7	-29	-7	15	24	81
1208	-21	-3	-10	84	89	82	20
1229							
1257	78	92	77	25	33	6	37
1260	90	92	12	17	24	12	8
1261	57	88	30	6	13	3	6
1277	32	28	8	77	85	64	20
1284	88	82	9	31	30	12	26
1308	71	81	19	0	12	4	11
1320	2	8	0	6	7	9	-9
1344	82	82	40	28	36	19	14
1428	91	94	34	11	17	18	14
Erbitux	-17	4	-4	21	-73	78	80
Erbitux	-22	2	-5	22	-81	78	88
Vectibix	-30	-12	-24	6	57	60	42
Vectibix	-13	-1	-6	16	64	68	46

Fig. 6A

Clon	I		II	III				Especificidad de epitopo
	ICR10	Ab-11	Ab-3	Ab-5	Ab-10	Ab-1	Ab-2	
992						+++	+++	Dominio III
1024					+		+++	Dominio III
1030				+++	+++	+++		Dominio III
1042							+++	Dominio III
1208				+++	+++	+++		Dominio III
1229								Desconocido
1257	+++	+++	+++	+	+		+	Dominio I / II
1260	+++	+++						Dominio I
1261	++	+++	+					Dominio I
1277	+	+		+++	+++	++		Dominio III
1284	+++	++		+	+		+	Dominio I
1308	++	+++						Dominio I
1320								Desconocido
1344	+++	+++	+	+	+			Dominio I
1428	+++	+++	+					Dominio I
Erbitux						+++	++	Dominio III
Erbitux						+++	++	Dominio III
Vectibix					++	++	+	Dominio III
Vectibix					++	++	+	Dominio III

Fig. 6B

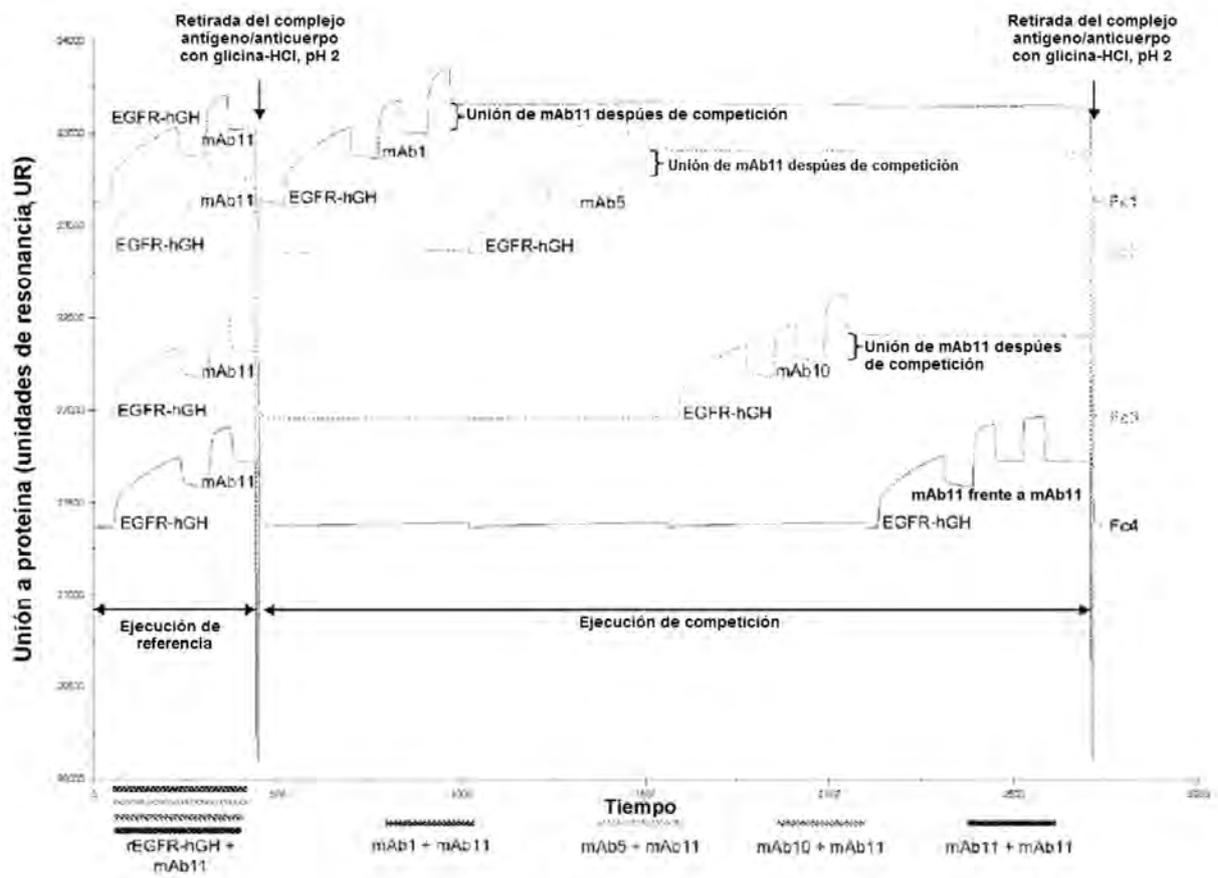


Fig. 7

Clon	I		II	III				
	ICR10	Ab-11	Ab-3	Ab-5	Ab-10	Ab-1	Erbitux	Vectibix
992	-4	-3	7	1	-4	99	99	106
1024	-3	-13	0	0	-5	6	104	102
1030	54	-5	6	104	84	98	-1	16
1042	-6	-8	0	10	-4	14	107	10
1208	5	4	5	66	32	37	18	29
1229*								
1257	22	100	65	-5	1	-1	0	-2
1260	91	99	54	1	12	7	8	10
1261	24	94	54	-3	-6	-4	-2	-5
1277	5	3	10	85	62	81	60	86
1284	86	-15	9	-13	-8	-9	-7	-13
1308	15	85	11	-4	-3	-5	-6	-8
1320	-3	-6	2	-3	-2	3	2	6
1344	87	86	25	-3	0	-2	-4	-5
1347	17	86	11	-1	-1	-3	-4	-6
1428	77	89	42	0	1	0	2	0
Erbitux	-3	-3	0	29	0	101	94	104
Vectibix	0	-4	5	0	0	88	79	102

Fig. 8A

Clon	I		II	III					Especificidad de epítipo
	ICR10	Ab-11	Ab-3	Ab-5	Ab-10	Ab-1	Erbitux	Vectibix	
992						+++	+++	+++	Dominio III
1024							+++	+++	Dominio III
1030	++			+++	+++	+++			Dominio III
1042							+++	+++	Dominio III
1208				++	+	+		+	Dominio III
1229*									Sin unión
1257		+++	+++						Dominio I / II
1260	+++	+++	++						Dominio I / II
1261		+++	++						Dominio I / II
1277				+++	++	+++	++	+++	Dominio III
1284	+++								Dominio I
1308		+++							Dominio I
1320									Desconocido
1344	+++	+++							Dominio I
1347		+++							Dominio I
1428	+++	+++	+						Dominio I / II
Erbitux				+		+++	+++	+++	Dominio III
Vectibix						+++	+++	+++	Dominio III

Fig. 8B

Clon	1284	1308	1344	1347
-	98	98	73	83
	78	75	67	85
	81	73	83	75
	83	82	88	83
	16	27	68	21
	87	94	89	46
	-8	-10	85	4
	6	-9	9	7
	-2	-3	1	2
	32	-12	24	6
	4	5	7	4
	6	-2	4	3
	9	9	-3	17
	-3	14	-1	1
	5	-9	7	-6
	5	-2	2	5
	5	-2	2	5
	2	-4	4	4
	22	35	-27	-13
	5	16	8	
	9	4	13	
	7	0	6	
	8	4	10	
	8	-1	12	
	2	1	8	
	2	-4	4	

I/II	1257	1260	1261
	0	78	4
	27	8	-9
	33	87	77
	19	41	-23
	30	68	108
	83	99	97
	23	75	87
	16	-10	-13
	22	35	-27
	5	16	8
	9	4	13
	7	0	6
	8	4	10
	8	-1	12
	2	1	8
	2	-4	4

III	992 corr	1024	1030corr	1042	1208	1254	1277	1449	Veetbix	Erbitux
	6	0	-5	-1	-2	-3	-3	-1	-2	-2
	-3	3	-2		1	0	7	-7	-7	-6
	9	3	31		3	-10	10	8	8	-4
	7	4	-2		0	0	6		-5	-4
	16	17	4	16	17	8	11	15	15	0
	-10	33	18	31	33	22	25	29	31	8
	14	-24	-6	-18	-24	-12	-19	-20	-21	-2
	-58	-65	-18	21	-38	28	136	80	85	90
	25	-1	89	11	32	37	38	4	17	-1
	25	3	27	9	28	33	40	31	33	18
	35	6	64	20	30	32	39	5	36	44
	37	5	73	22	32	38	43	6	39	48
	39	8	8	34	38	44	49	9	41	52
	41	19	8	73	88	97	99	73	68	79
	42	19	8	73	88	97	99	73	68	79
	28									94
	-27	18	0	48	-3	3	0	30	14	2

Desconocido	1320
	-1
	2
	8
	2
	15
	26
	-18
	-38
	4
	30
	6
	7
	82
	28
	99

Fig. 9A

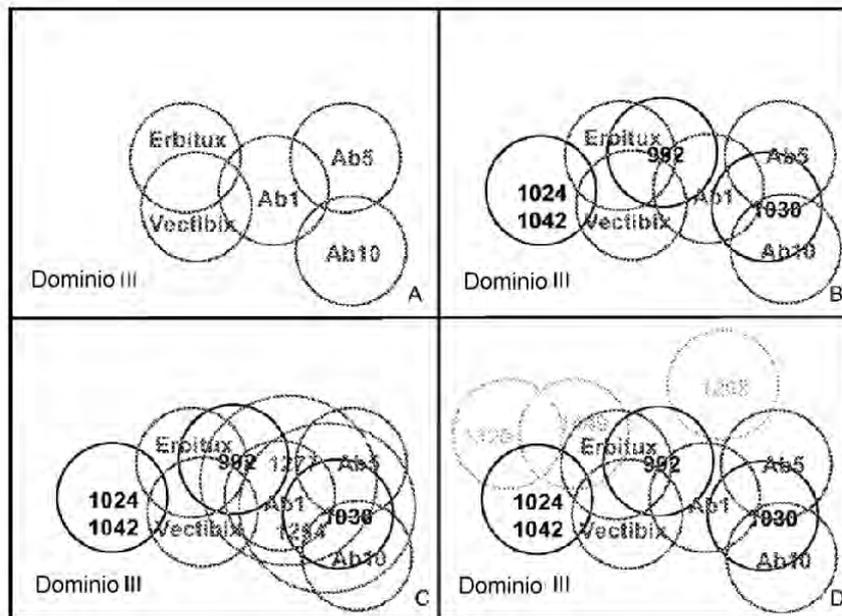
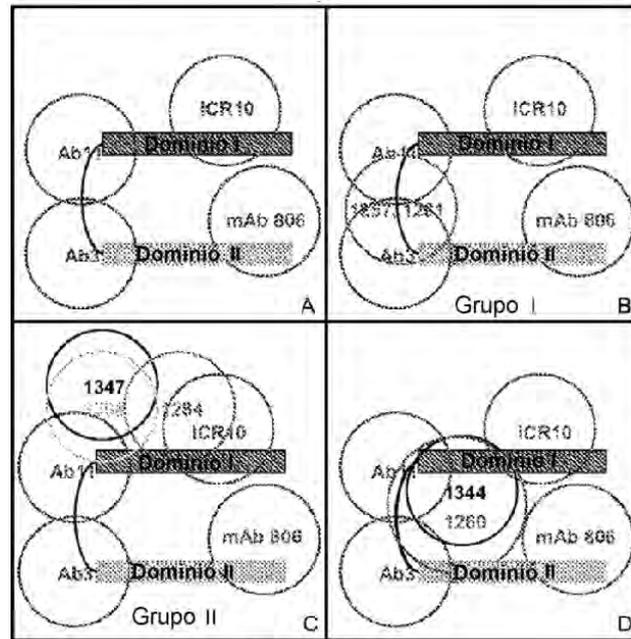
Clon	1284	1308	1344	1347
-	98	98	73	83
	78	75	67	85
	81	73	83	75
	83	82	88	83
	16	27	68	21
	87	94	89	46
	-8	-10	85	4
	6	-9	9	7
	-2	-3	1	2
	32	-12	24	6
	4	5	7	4
	6	-2	4	3
	9	9	-3	17
	-3	14	-1	1
	5	-9	7	-6
	5	-2	2	5
	5	-2	2	5
	2	-4	4	4
	22	35	-27	-13
	5	16	8	
	9	4	13	
	7	0	6	
	8	4	10	
	8	-1	12	
	2	1	8	
	2	-4	4	

I/II	1257	1260	1261
	0	78	4
	27	8	-9
	33	87	77
	19	41	-23
	30	68	108
	83	99	97
	23	75	87
	16	-10	-13
	22	35	-27
	5	16	8
	9	4	13
	7	0	6
	8	4	10
	8	-1	12
	2	1	8
	2	-4	4

III	992 corr	1024	1030corr	1042	1208	1254	1277	1449	Veetbix	Erbitux
	6	0	-5	-1	-2	-3	-3	-1	-2	-2
	-3	3	-2		1	0	7	-7	-7	-6
	9	3	31		3	-10	10	8	8	-4
	7	4	-2		0	0	6		-5	-4
	16	17	4	16	17	8	11	15	15	0
	-10	33	18	31	33	22	25	29	31	8
	14	-24	-6	-18	-24	-12	-19	-20	-21	-2
	-58	-65	-18	21	-38	28	136	80	85	90
	25	-1	89	11	32	37	38	4	17	-1
	25	3	27	9	28	33	40	31	33	18
	35	6	64	20	30	32	39	5	36	44
	37	5	73	22	32	38	43	6	39	48
	39	8	8	34	38	44	49	9	41	52
	41	19	8	73	88	97	99	73	68	79
	42	19	8	73	88	97	99	73	68	79
	28									94
	-27	18	0	48	-3	3	0	30	14	2

Desconocido	1320
	-1
	2
	8
	2
	15
	26
	-18
	-38
	4
	30
	6
	7
	82
	28
	99

Fig. 9B



mAb de muestra	Inhibición mAb de muestra	Urmáx Ciclo de referencia	Urmáx Ciclo de competición
Dominio III 992	1030 frente a 992 -6	81	85 ^{AA}
Dominio III 1024	992 + 1030 frente a 1024 -26	100	126 ^{AA}
Dominio I/II 1261	992 + 1030 + 1024 frente a 1261 -19	157	177 ^{AA}
Dominio I 1347	992 + 1030 + 1024 frente a 1347 -5	75	79 ^{AA}
Dominio Desconocido 1361	992+1030+1024 frente a 1361 -11	162	181 ^{AA}

Fig. 11A

mAb de muestra	Mezcla de anticuerpos (N=6) 1261+1347+992+1024+1030+1361			Mezcla de anticuerpos (N=6-1) mAb de muestra sin ensayar		
	Inhibición mAb de muestra	Urmáx de Referencia	Urmáx de Competición	Inhibición mAb de muestra	Urmáx de Referencia	Urmáx de Competición
		Ciclo	Ciclo		Ciclo	Ciclo
Dominio I/II 1261	1261+1347+992+1024+1030+1361 frente a 1261 -95	135	7	1347+992+1024+1030+1361 frente a 1261 -21	139	168 ^{AA}
Dominio I 1347	1261+1347+992+1024+1030+1361 frente a 1347 -89	91	19	1261+992+1024+1030+1361 frente a 1347 -16	107	92
Dominio III 992	1261+1347+992+1024+1030+1361 frente a 992 -116	85	-14*	1261+1347+1024+1030+1361 frente a 992 -56	71	111 ^{AA}
Dominio III 1024	1261+1347+992+1024+1030+1361 frente a 1024 -113	110	-14*	1261+1347+992+1030+1361 frente a 1024 -24	122	152 ^{AA}
Dominio III 1030	1261+1347+992+1024+1030+1361 frente a 1030 -87	87	12	1261+1347+992+1024+1361 frente a 1030 -10	74	82 ^{AA}
Dominio Desconocido 1361	1261+1347+992+1024+1030+1361 frente a 1361 -102	178	-3*	1261+1347+992+1024+1030 frente a 1361 -4	159	152

Fig. 11B

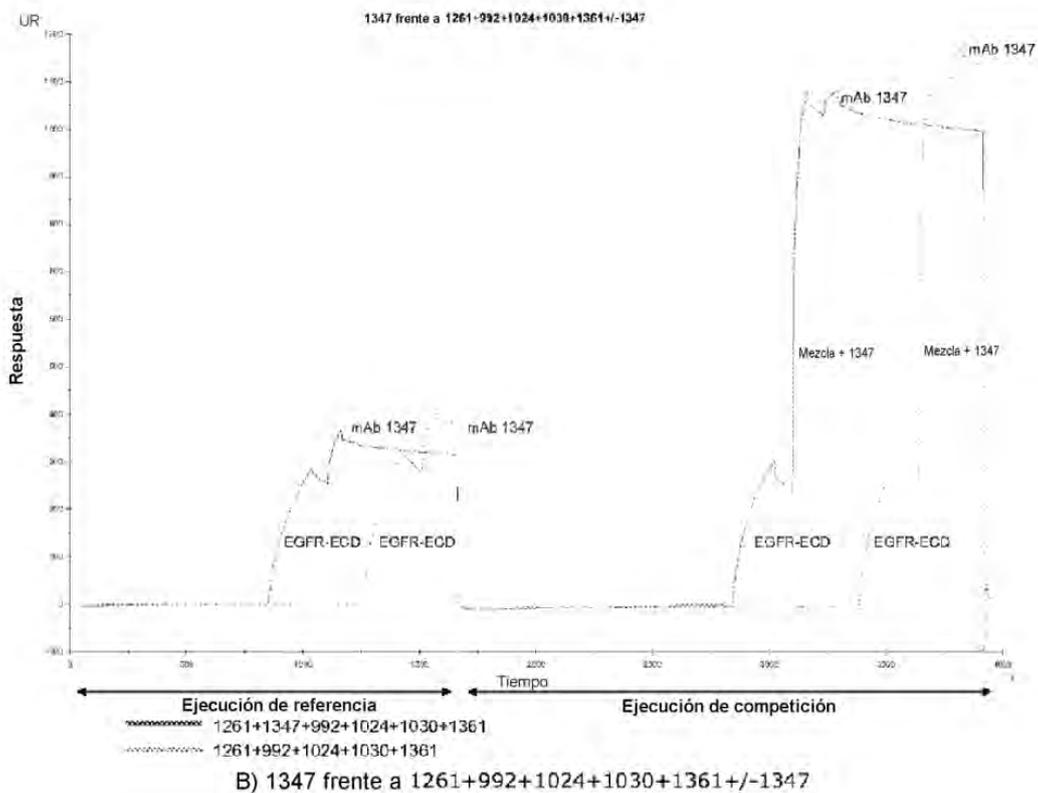
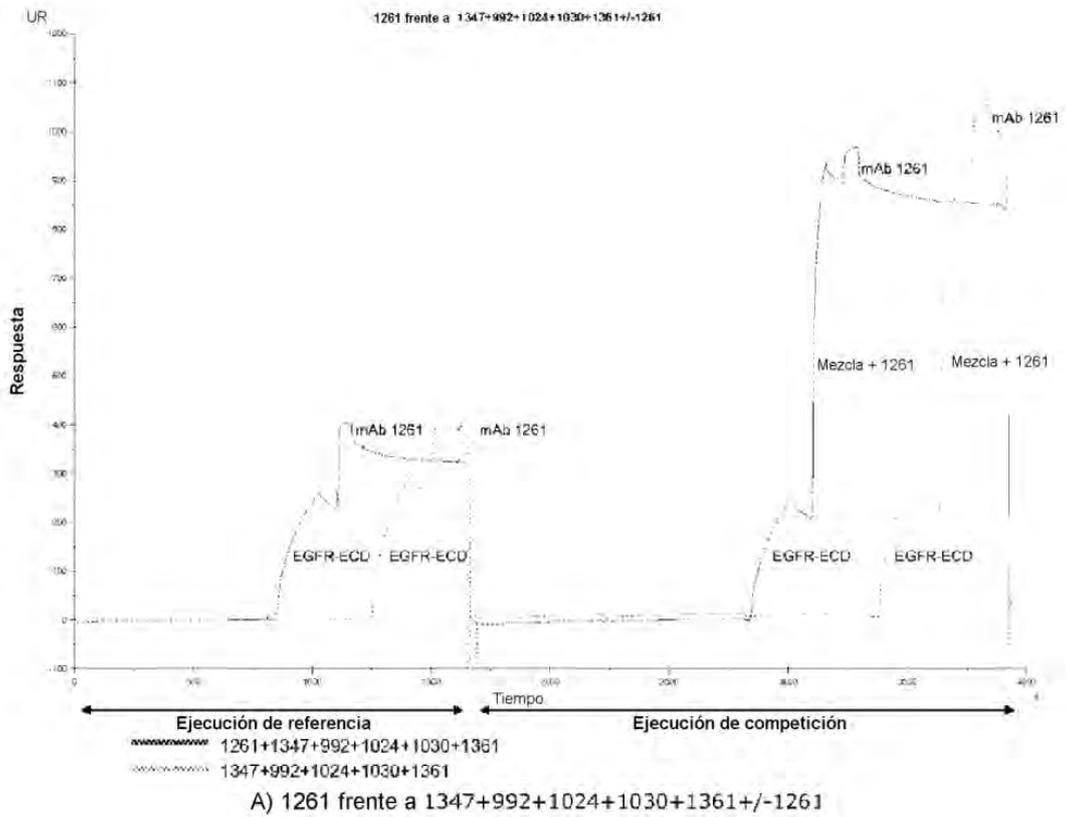


Fig. 11C

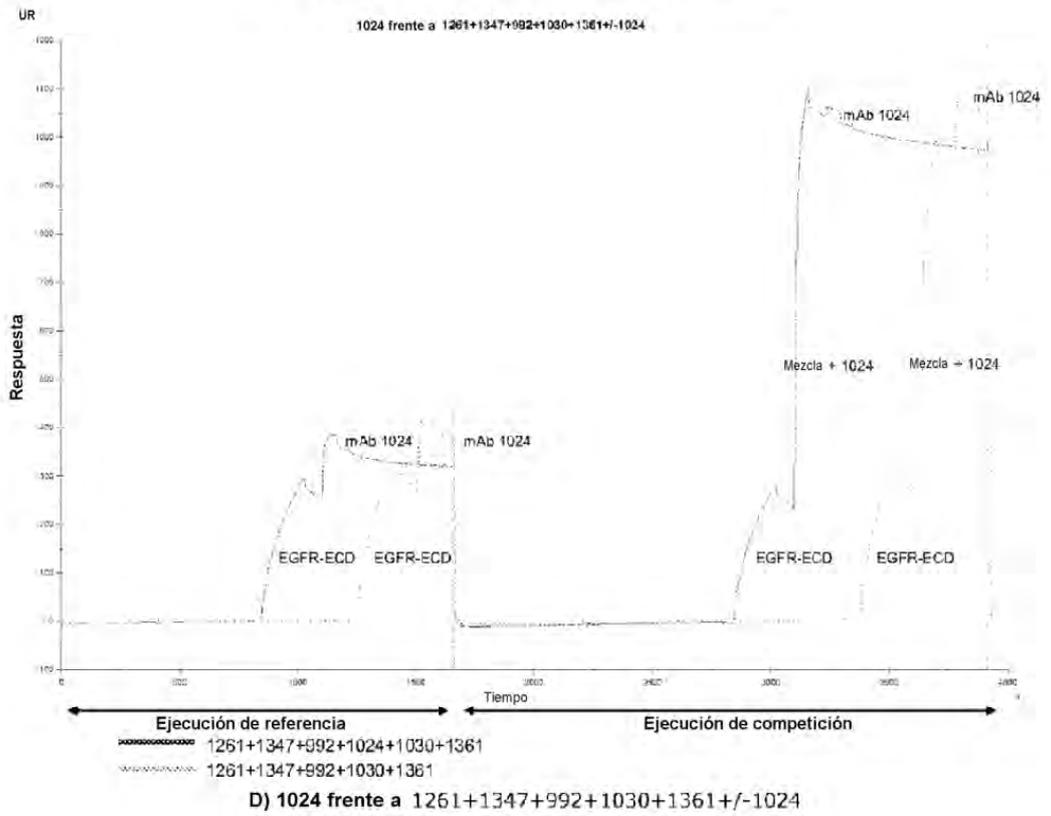
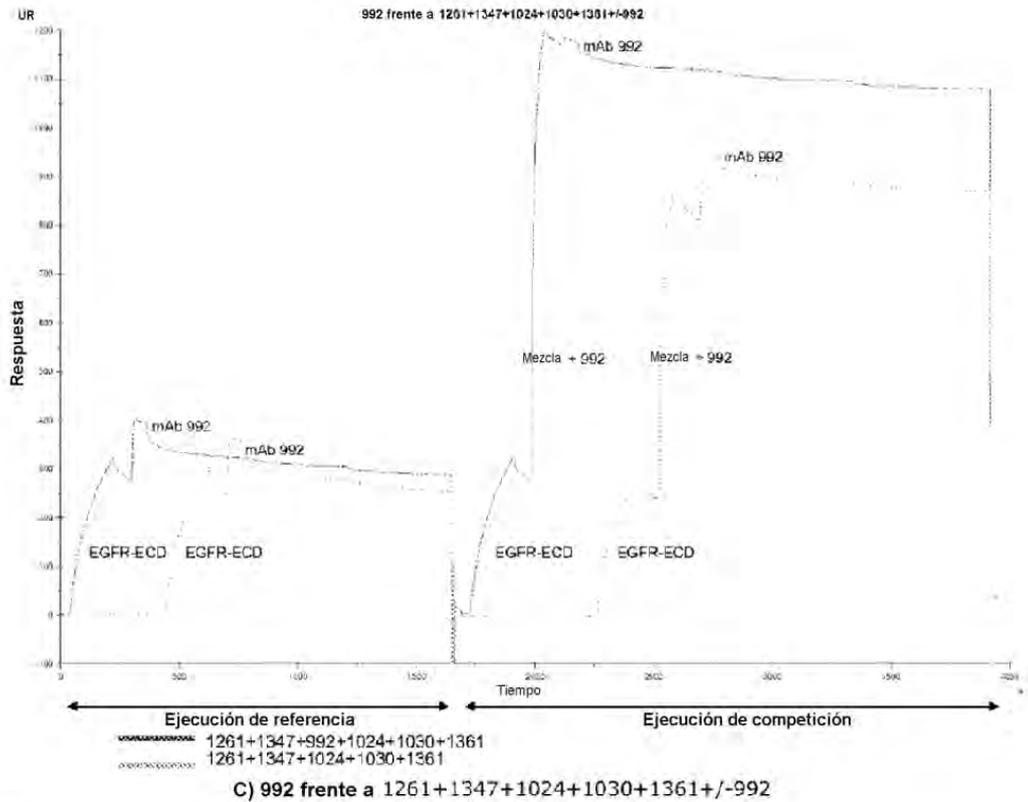
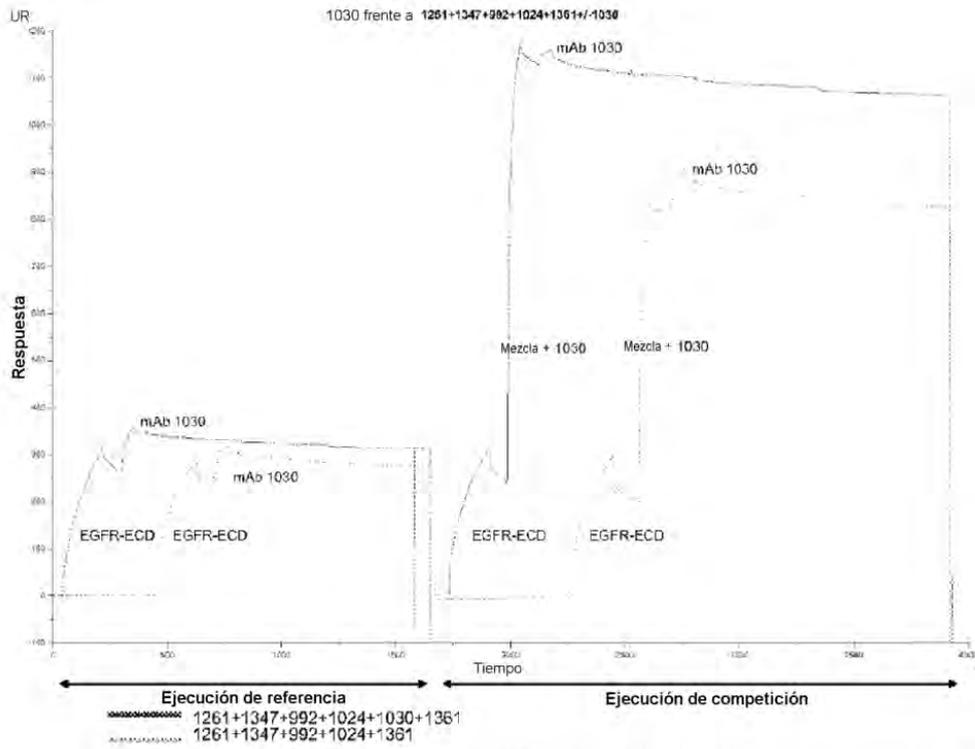
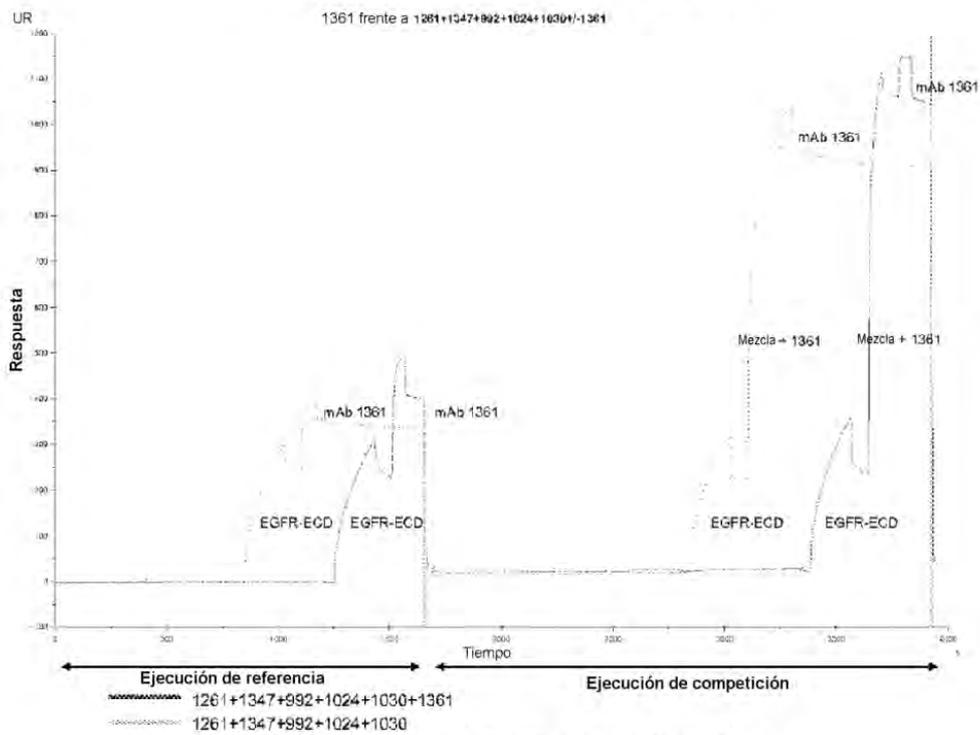


Fig. 11C (Cont.)



E) 1030 frente a 1261+1347+992+1024+1361+/-1030



F) 1361 frente a 1261+1347+992+1024+1030+/-1361

Fig. 11C (cont.)

Dominio I	1261+1347+992+1024+1030+1361		
1284	frente a 1284 75	68	17
Dominio I/II	1261+1347+992+1024+1030+1361		
1257	frente a 1257 106	107	-7*
Dominio Desconocido	1261+1347+992+1024+1030+1361		
1183	frente a 1183 112	56	-7*
Dominio Desconocido	1261+1347+992+1024+1030+1361		
1255	frente a 1255 107	79	-5*

Fig. 11D

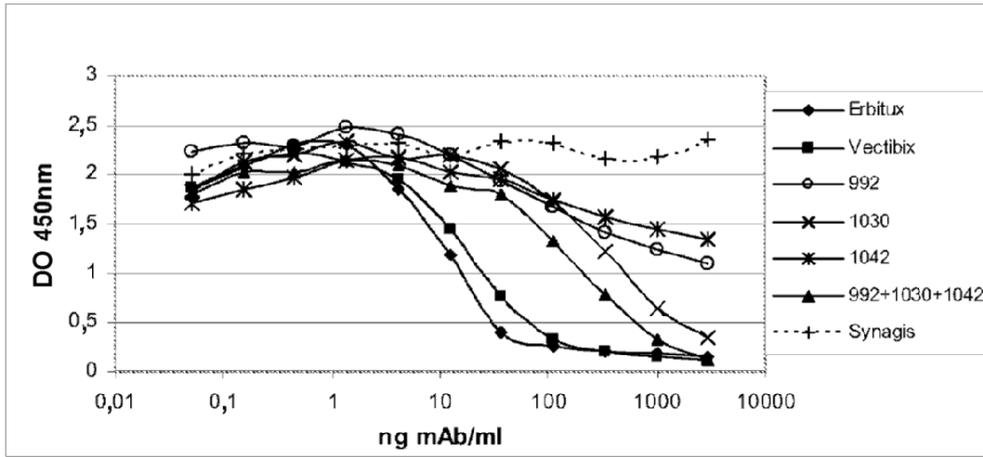


Fig. 12A

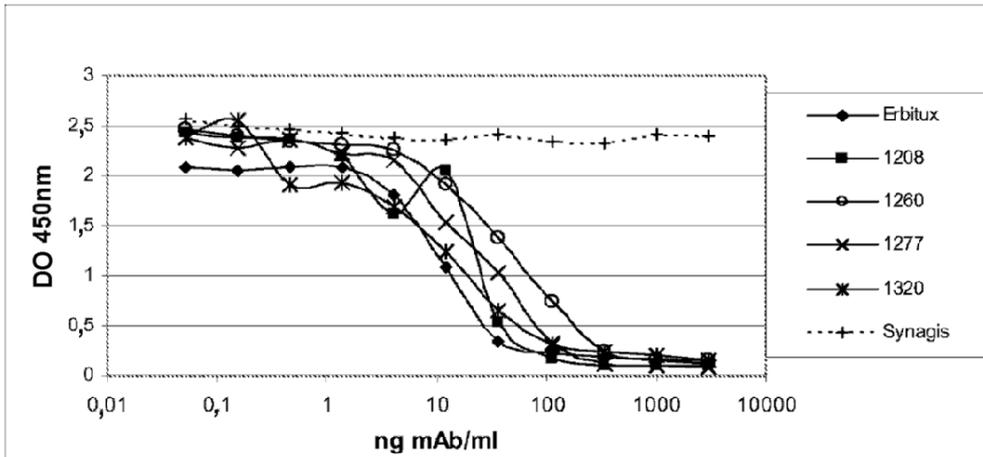


Fig. 12B

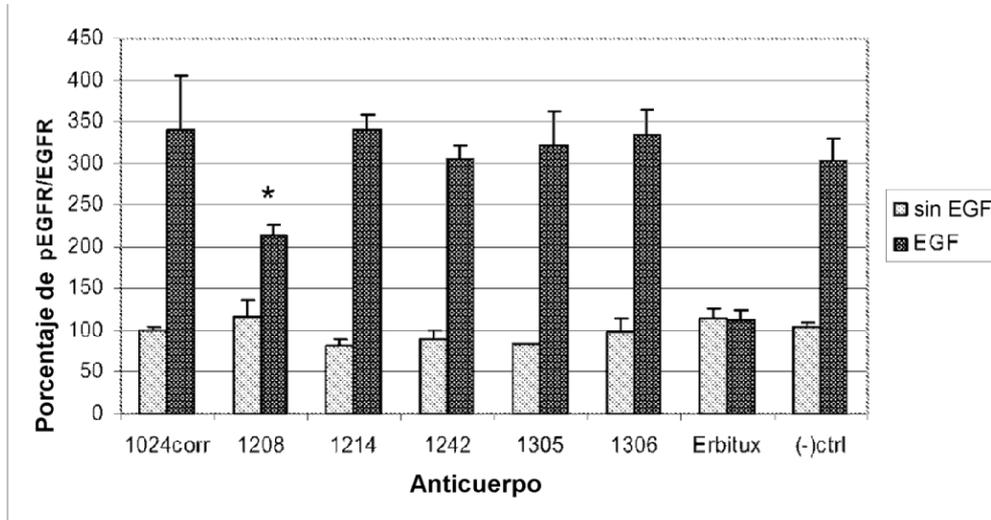


Fig. 13A

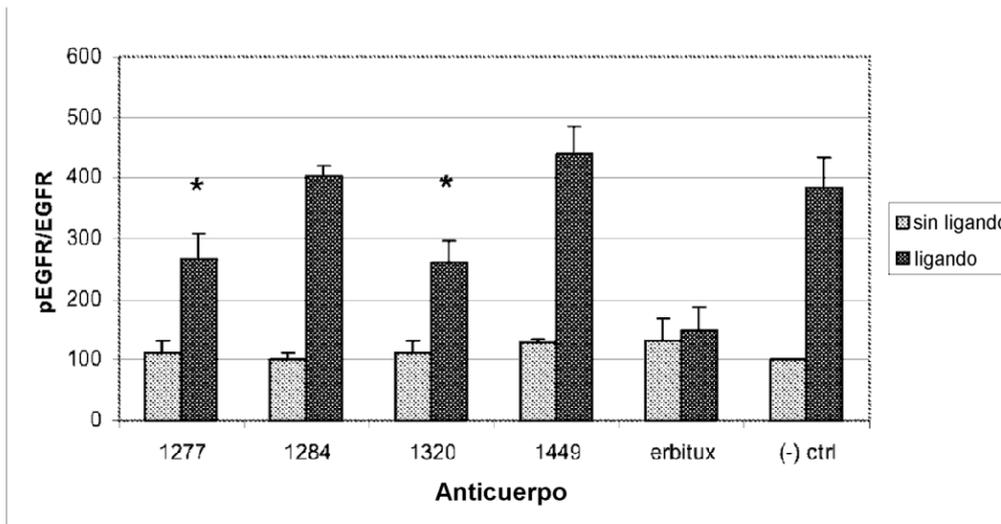


Fig. 13B

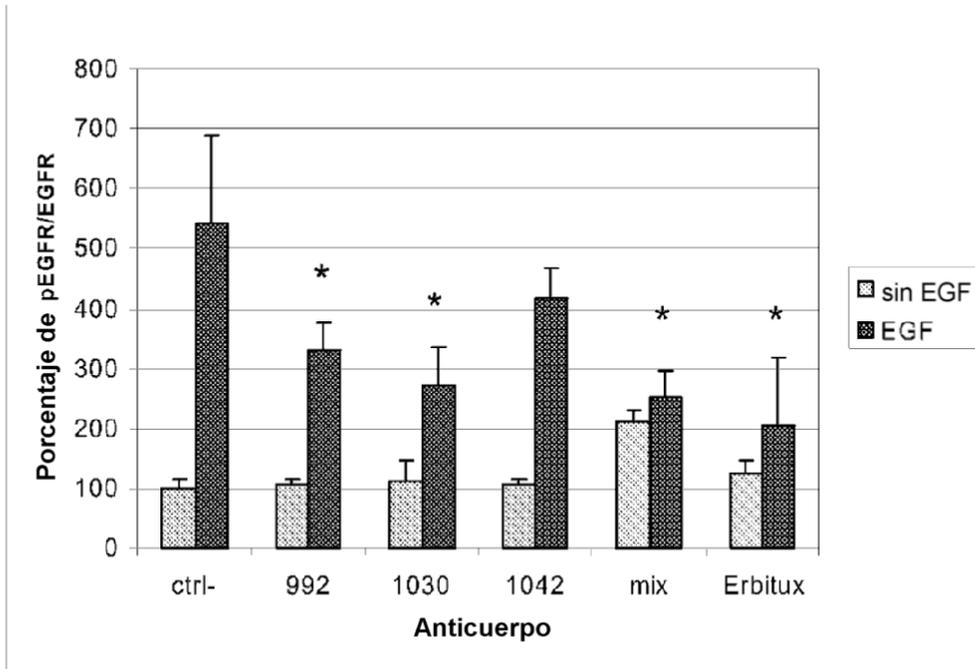


Fig. 14

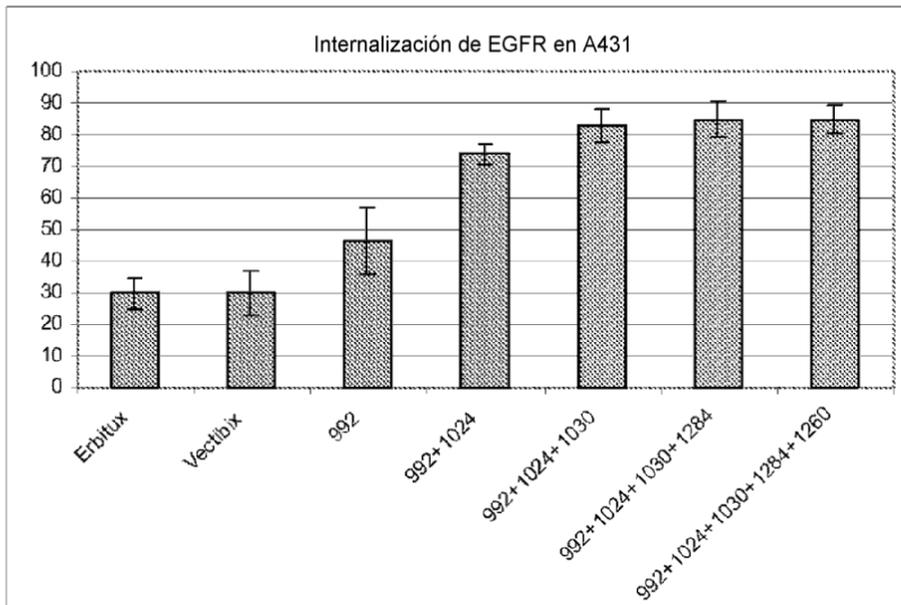


Fig. 15

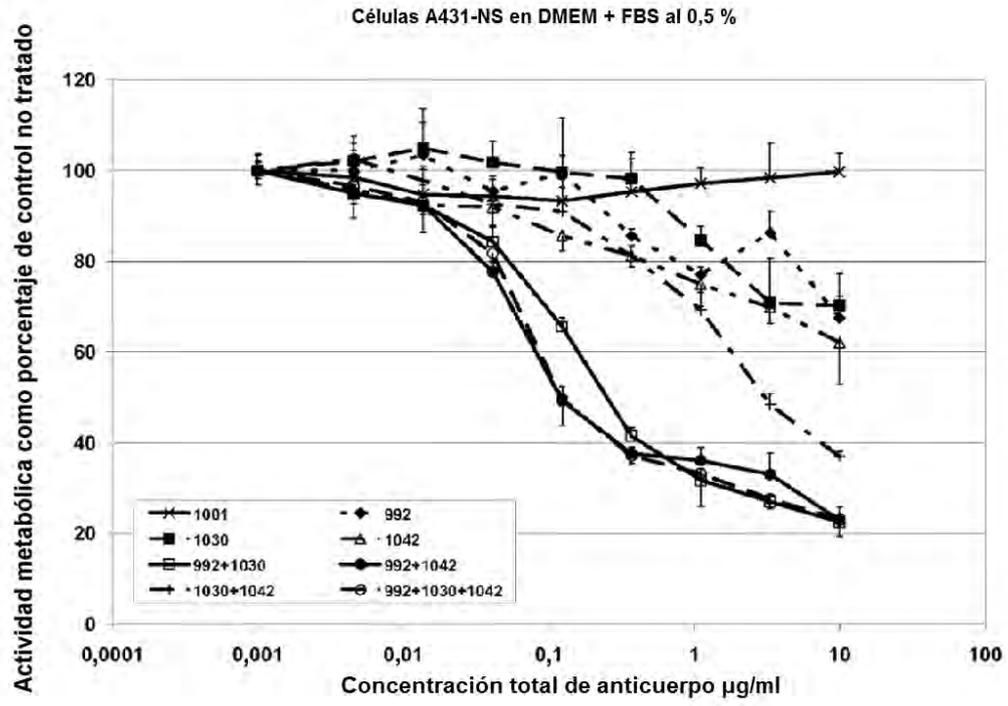


Fig. 16A

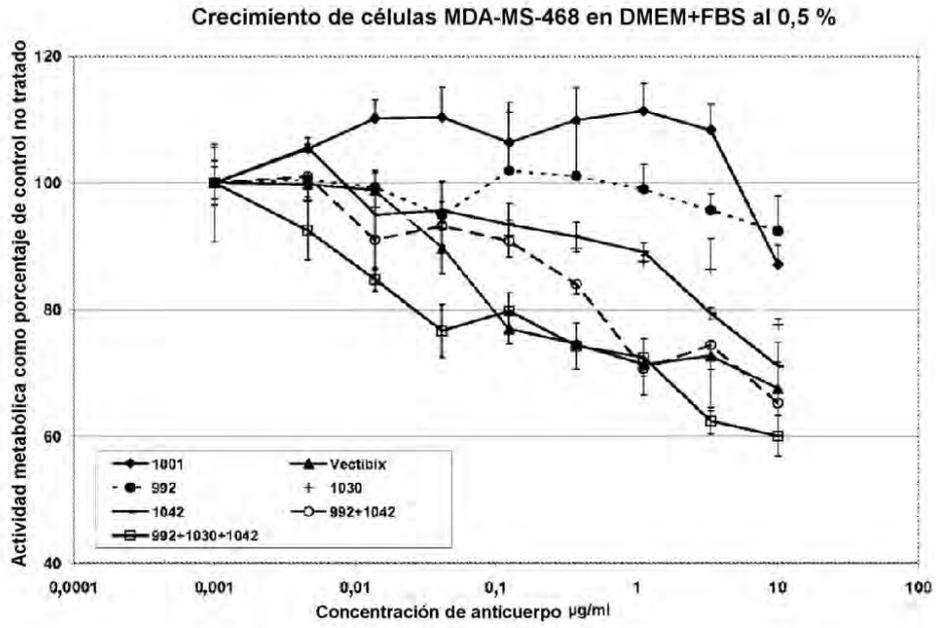


Fig. 16B

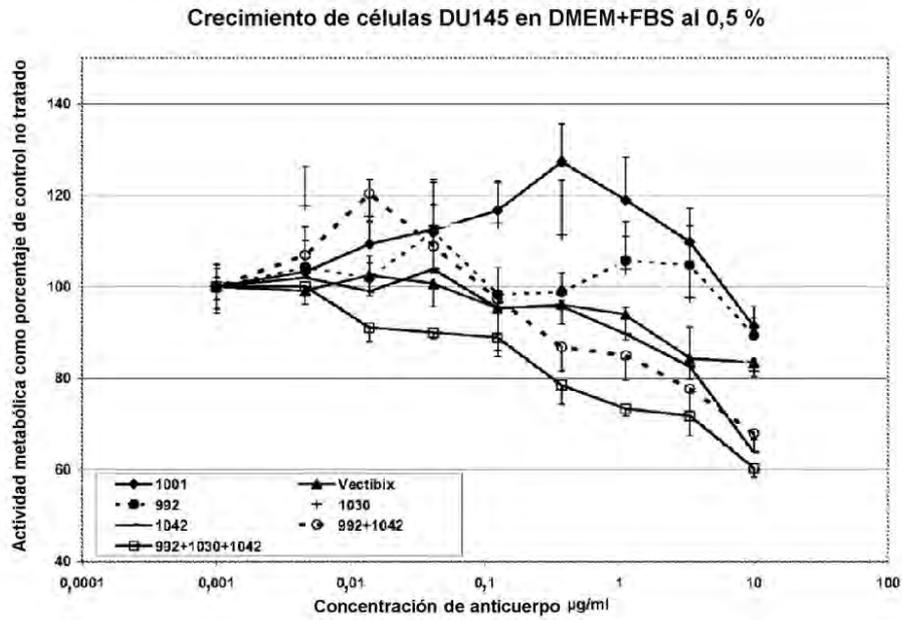


Fig. 16C

Efecto de 10 µg/ml de anticuerpo total sobre la actividad metabólica de células A431-NS en presencia de diferentes concentraciones de EGF

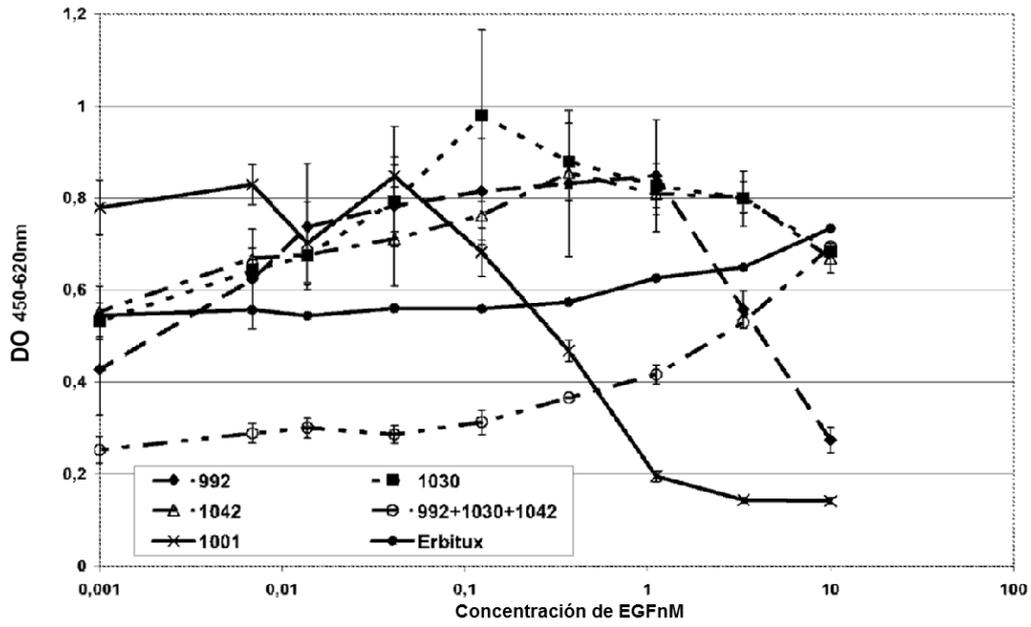


Fig. 17

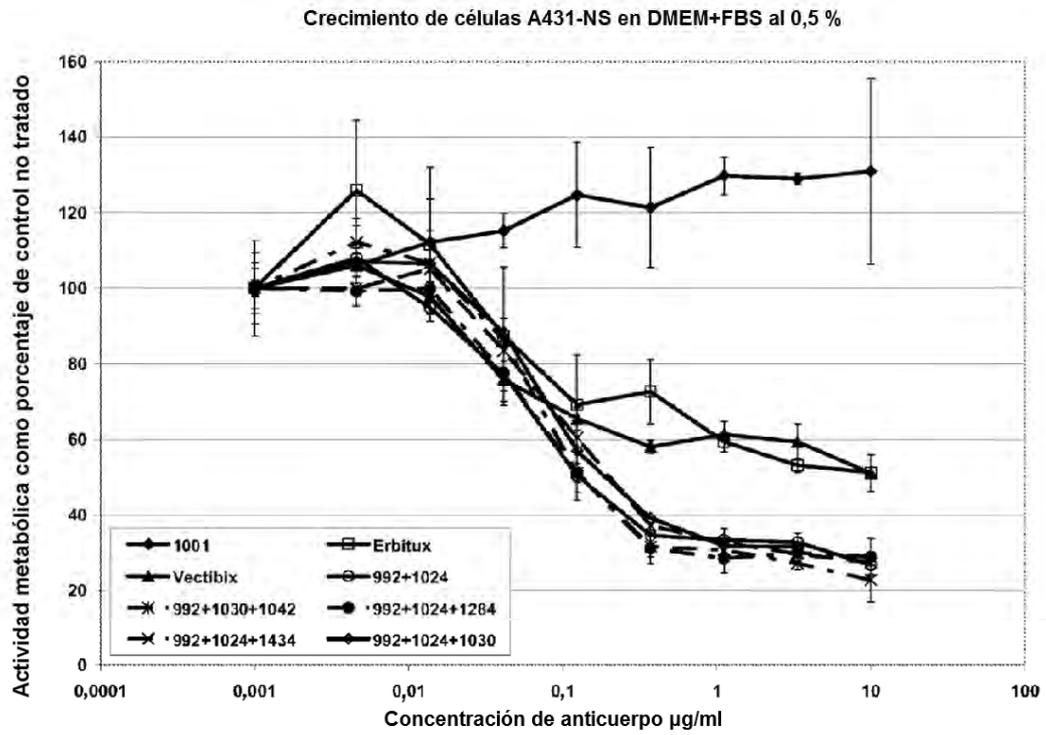


Fig. 18

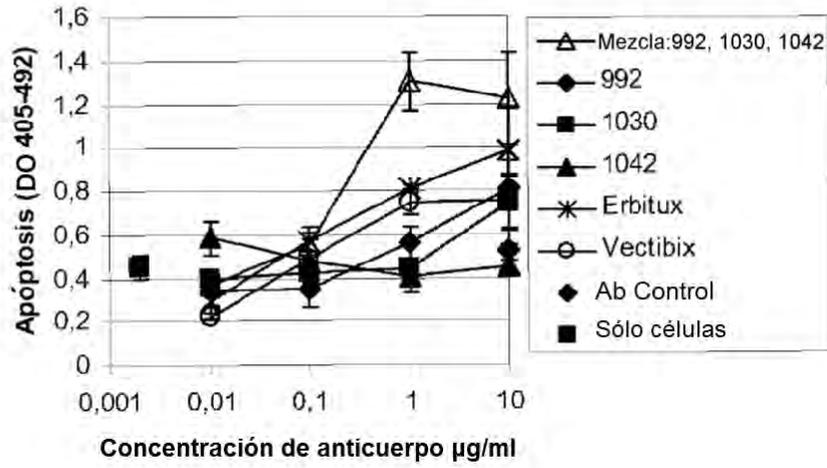


Fig. 19

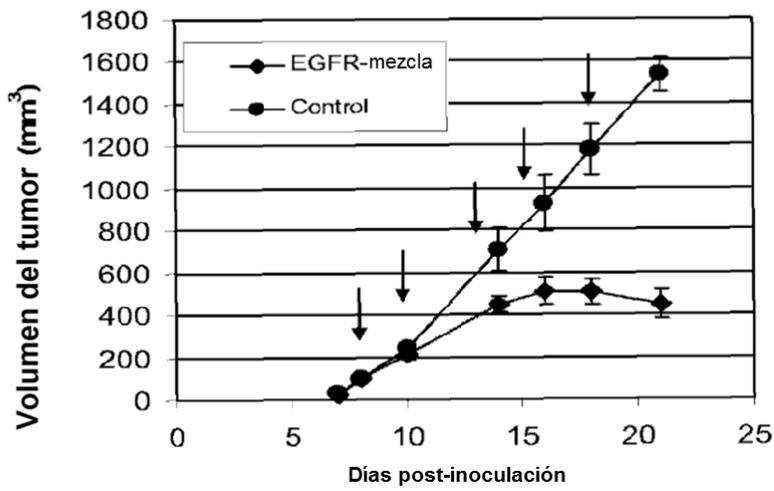


Fig. 20

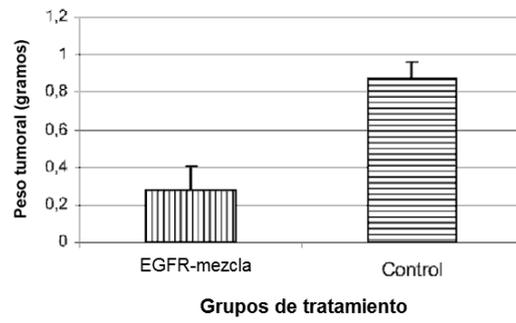


Fig.21

Efecto de 10 µg/ml de los anticuerpos indicados sobre el crecimiento de esferoides de A431NS

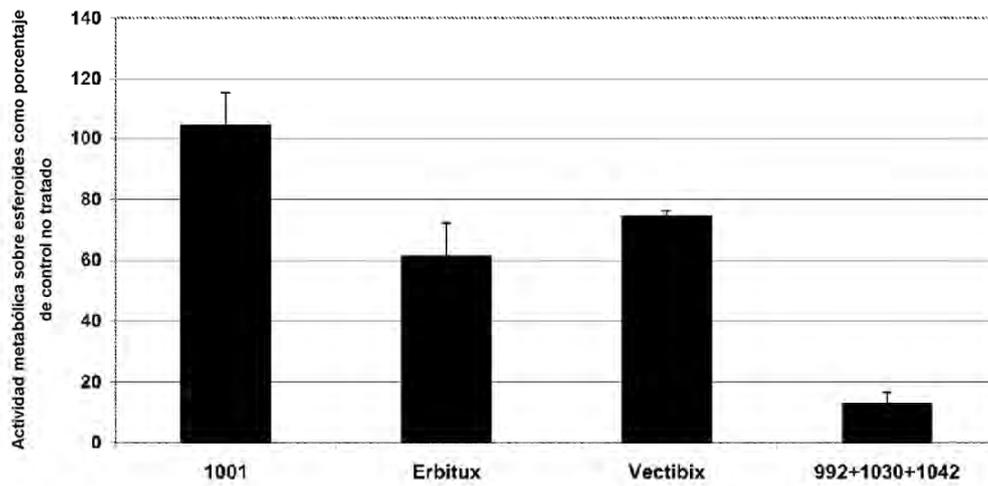


Fig. 22

ES 2 582 386 T3

ctggaggaaaagaaagtttgccaaggcagagtaacaaactcacgcagttgggcacttttgaagatcatt
ttctcagcctcagaggatgttcaataactgtgaggtggtecttgggaatttggaaattacctacgtgca
gaggaattatgatctttctctttaaagaccatccaggaggtggctggttatgtcctcatcgccctcaac
acagtgaggcggattccttttgaaaaacctgcagatcatcagaggaaacatgtactatgaaaattcctatg
ccttagcagttttatctaaactatgatgcaaaataaaaacggactgaaggagctgccatgagaaaacttaca
ggaaatcctgcatggcgccgtgcggttcagcaacaacctgcccctgtgcaacgtggagagcatccagtgg
cgggacatagtcagcagcgagtctctcagcaacatgtcagtgacttccagaaccacctgggcagctgcc
aaaagtgtgatccaagctgtcccaatgggagctgtgggggtgcaggagaggagaactgccagaaaactgac
caaaatcatctgtgccagcagtgctccggggcgtgcccgggcaagtcctccagtgactgctgccacaac
cagtggtgccggggtgcacgggccccgggagagcgactgcctggtctgccgcaaattccgagacgaag
ccacgtgcaaggacacctgcccccaactcatgctetacaaacccccaccacataccagatggatgtgaacc
cgaggggcaatacagctttggtgccacctgctgaagaagtgtcccctgaattatgtggtgacagatcac
ggtcctgtgctccgagcctgcccggcgacagctatgagatggaggaagacggcgctccgcaagtgaaga
agtgcaagggtccttgcgcgaaagtgtgtaatggaataggtattggtgaatttaaagacacactctccat
aaatgctacaaatattaacaacttcaaaaaactgcacctccatcagtggggatctccacatcctgccgggtg
gcatttaggggtgactccttccacacacactccgctctggatccacaggaaactggatattctgaaaaccg
taaaggaaatcacagggtttttgtgatccaggttggcctgaaaacaggagcctccatgcttttga
gaacctagaaatcatacgtggcaggaccaagcaacacggtcagttttctcttggggctgctcagcctgaac
ataacatccttgggattacgctcctcaaggagataagcgatggagatgtgataatttcaggaaacaaaa
atgtgtctatgcaaaatacaataaaactggaaaaaactgtttgggacctccagtcagaaaacccaaattat
aagcaacagaggtgaaaaacagctgcaaggccacgggcccaggtctgccatgcttgtgctccccgagggc
tgctggggcccgagcccagggtgctgctcctgccagaatgtcagccgaggcagagaatgctggtggaca
agtgaacatcctggaggggcagccaagggagtgtgtggagaactctgagtgcatcagtgccaccaga
atgctgcccaggtcatgaacatccctgcacaggacggggaccagacaactgtatccagtggtgccac
tacattgacggcccccaactgctcaagacctgcccagcaggagtcatgggagaaaaacaacacctggtct
ggaagtacgcagacggcggccagctgtgccacctgtgccatccaaactgcacctacggatgcaactgggccc
aggtcttgaaggctgtgcaaggaaacgggacctaatccatcc

Fig. 23A

LEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNNCVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLIALN
TVERIPLLENLQIIRGNMYEENSALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQW
RDISSSEFLSNMSMDFQNHLSGQKCDPSCPNGSCWAGAGEENCQKLTKIICAQQCSGRCRGKSPSDCCHN
QCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDH
GSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDTLSINATNIKHFKNCTSI SGLHLILPV
AFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIRGRTKQHGFSLAVVSLN
ITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCYANTINWKKLFGTSSQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEG
CWGPEPRDCVSCQNVSRGRECVKCNILEGEPREFVENSECIQCHPECLPQVMNITCTGRGPDNCIQCAH
YIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLHPNCTYGCTGPGLEGARNGPKIPS

Fig. 23B

ECD de EGFR de cinomolgo	(1)	1	10	20	30	47
ECD de EGFR de humano	(1)	LEEKKVCQQTENKLTQLGDTFEDHFLSLQRMENNCEVVLGNLEITTVQ				
Consenso	(1)	LEEKKVCQQTENKLTQLGDTFEDHFLSLQRMENNCEVVLGNLEITTVQ				
Sección 2						
ECD de EGFR de cinomolgo	(48)	48	60	70	80	94
ECD de EGFR de humano	(48)	RNYDLSFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIFLENLQIIRGNMYIENSYA				
Consenso	(48)	RNYDLSFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIFLENLQIIRGNMYIENSYA				
Sección 3						
ECD de EGFR de cinomolgo	(95)	95	100	110	120	141
ECD de EGFR de humano	(95)	LAVLSNYDANKTGLKELPMRNLOEILHGAVRFSSNNPALCNVESTQWR				
Consenso	(95)	LAVLSNYDANKTGLKELPMRNLOEILHGAVRFSSNNPALCNVESTQWR				
Sección 4						
ECD de EGFR de cinomolgo	(142)	142	150	160	170	188
ECD de EGFR de humano	(142)	DIVSSDFLSNMSKDFQNHLSGCGKCDPSCPNSGCGWAGEENCQKLTG				
Consenso	(142)	DIVSSDFLSNMSKDFQNHLSGCGKCDPSCPNSGCGWAGEENCQKLTG				
Sección 5						
ECD de EGFR de cinomolgo	(189)	189	200	210	220	235
ECD de EGFR de humano	(189)	IICAQQCSGRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEAT				
Consenso	(189)	IICAQQCSGRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEAT				
Sección 6						
ECD de EGFR de cinomolgo	(236)	236	250	260	270	282
ECD de EGFR de humano	(236)	CKDTCPPPLMLYNPTTYQMDVNFEGKYSFGATCVKKCPERNYVVDHGS				
Consenso	(236)	CKDTCPPPLMLYNPTTYQMDVNFEGKYSFGATCVKKCPERNYVVDHGS				
Sección 7						
ECD de EGFR de cinomolgo	(283)	283	290	300	310	329
ECD de EGFR de humano	(283)	CVFACGADSEYMEEDGVRKCKKCEGPKRVKCNIGIGIGEFKDSLSINA				
Consenso	(283)	CVFACGADSEYMEEDGVRKCKKCEGPKRVKCNIGIGIGEFKDSLSINA				
Sección 8						
ECD de EGFR de cinomolgo	(330)	330	340	350	360	378
ECD de EGFR de humano	(330)	TNIKHFKNCTSISSGDLHILFVAFRGDSFTHTPPLDGFQELDLKTVKE				
Consenso	(330)	TNIKHFKNCTSISSGDLHILFVAFRGDSFTHTPPLDGFQELDLKTVKE				
Sección 9						
ECD de EGFR de cinomolgo	(377)	377	390	400	410	423
ECD de EGFR de humano	(377)	ITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEILRGTQKHGQFSLAVVSLNITS				
Consenso	(377)	ITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEILRGTQKHGQFSLAVVSLNITS				

Fig.24

ES 2 582 386 T3

ECD de EGFR de cinomolgo	(424)	424	430	440	450	460	470
ECD de EGFR de humano	(424)	LGLRSLKEISDDGVIIISGNKNLCYANTINWKKLFGFRSQETKLIISNR					
Consenso	(424)	LGLRSLKEISDDGVIIISGNKNLCYANTINWKKLFGFRSQETKLIISNR					
Sección 11							
ECD de EGFR de cinomolgo	(471)	471	480	490	500		517
ECD de EGFR de humano	(471)	GENSCKATGQVCHALCSFEGCWGPEPDCVSCRNVSRRGRCVDKONI					
Consenso	(471)	GENSCKATGQVCHALCSFEGCWGPEPDCVSCRNVSRRGRCVDKONI					
Sección 12							
ECD de EGFR de cinomolgo	(518)	518	530	540	550		564
ECD de EGFR de humano	(518)	LEGEPRREFVENSECIQCHPECLPQVMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDG					
Consenso	(518)	LEGEPRREFVENSECIQCHPECLPQVMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDG					
Sección 13							
ECD de EGFR de cinomolgo	(565)	565	570	580	590	600	611
ECD de EGFR de humano	(565)	PHCVKTCFAGVGMGEMNTLVWXYADAGHVCHLCHPNCTYGGTGGGLEG					
Consenso	(565)	PHCVKTCFAGVGMGEMNTLVWXYADAGHVCHLCHPNCTYGGTGGGLEG					
Sección 14							
ECD de EGFR de cinomolgo	(612)	612	622				
ECD de EGFR de humano	(612)	CARGENIES-					
Consenso	(612)	CPTNGENIES-					
	(612)	C NGPKIPS					

Fig.24 (Cont.)

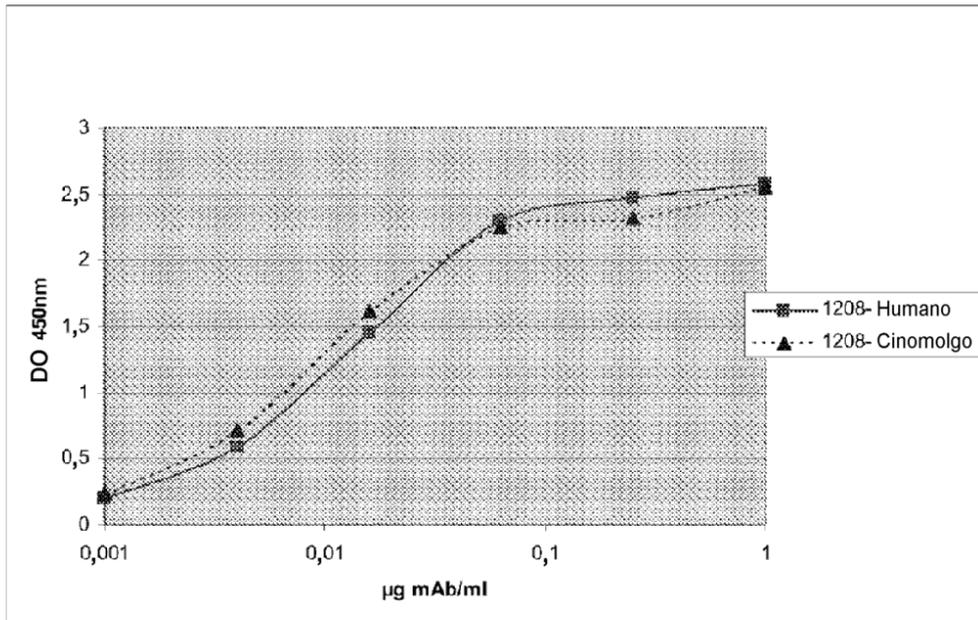


Fig. 25 A

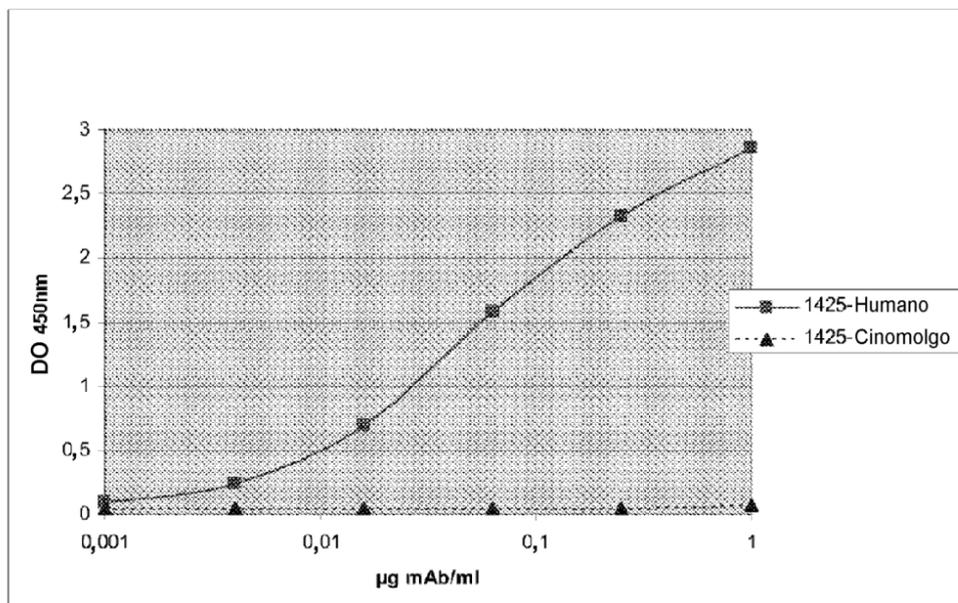


Fig. 25 B

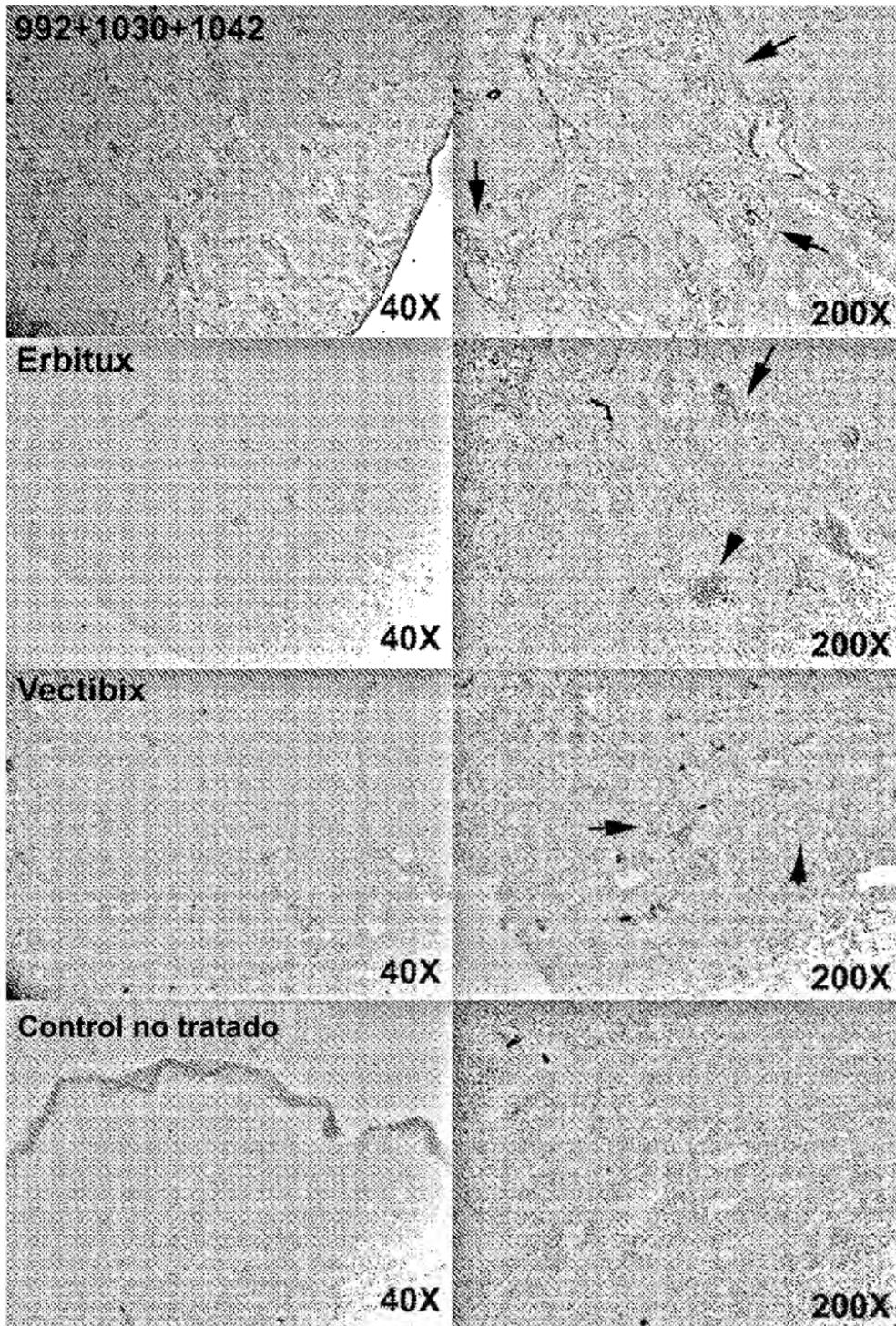


Fig. 26

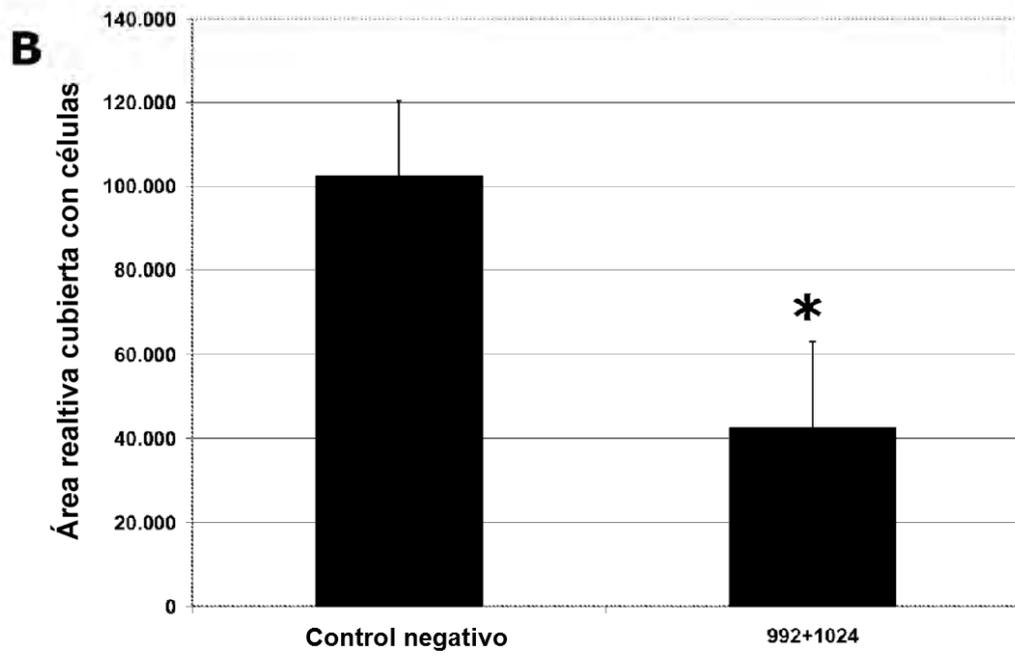
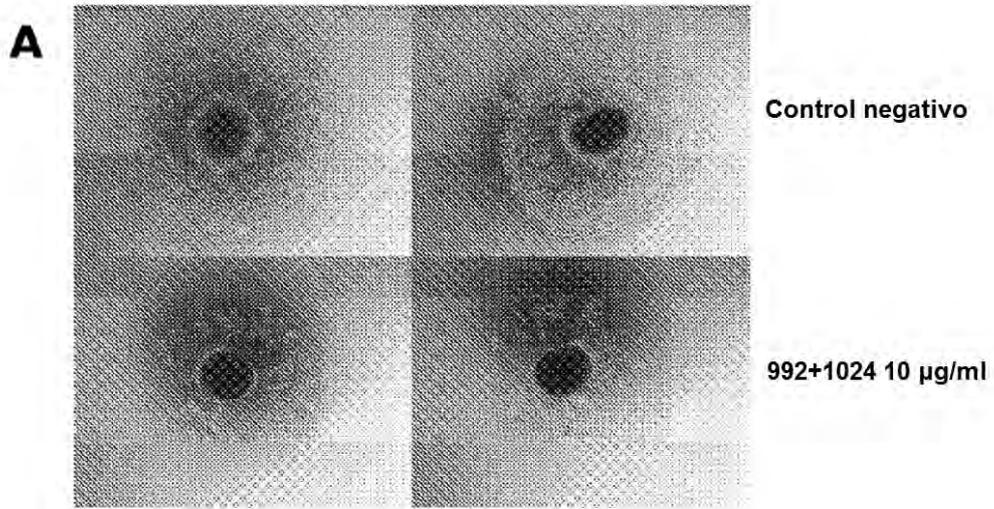


Fig. 27

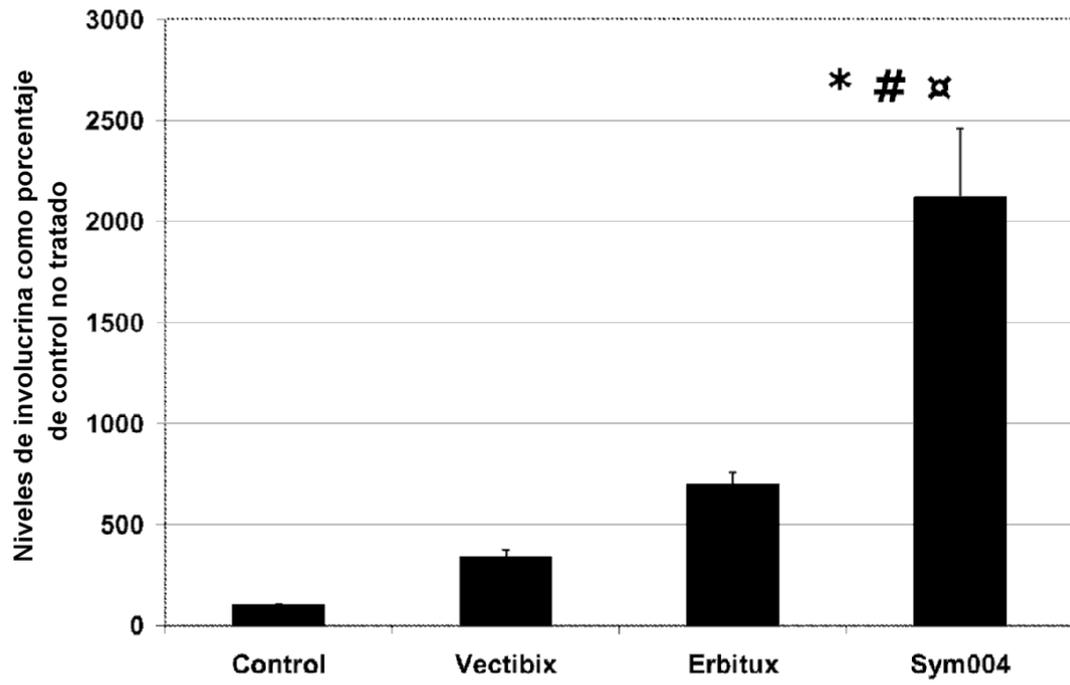
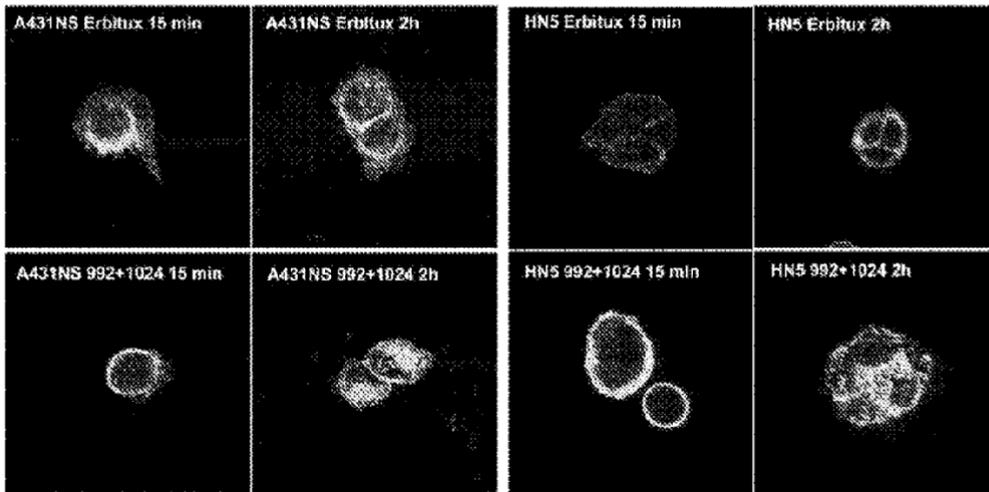


Fig. 28

A)



B)

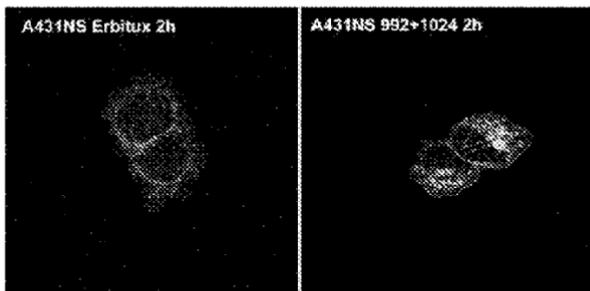


Fig. 29

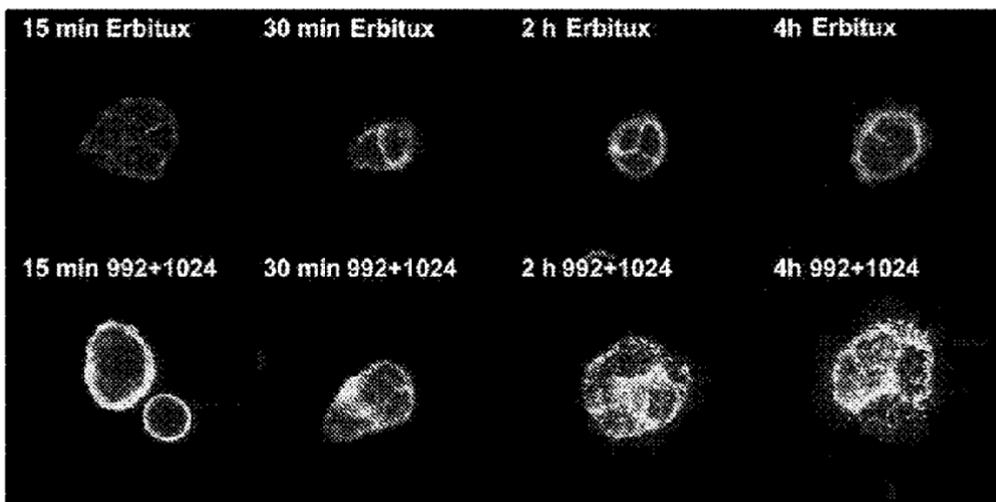


Fig. 30

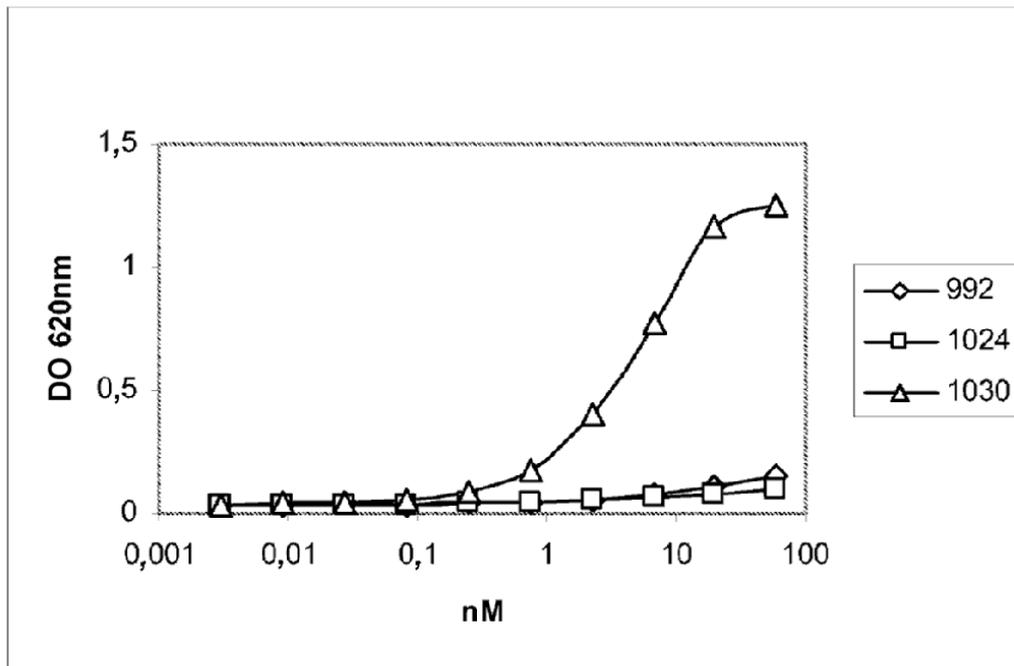


Fig. 31A

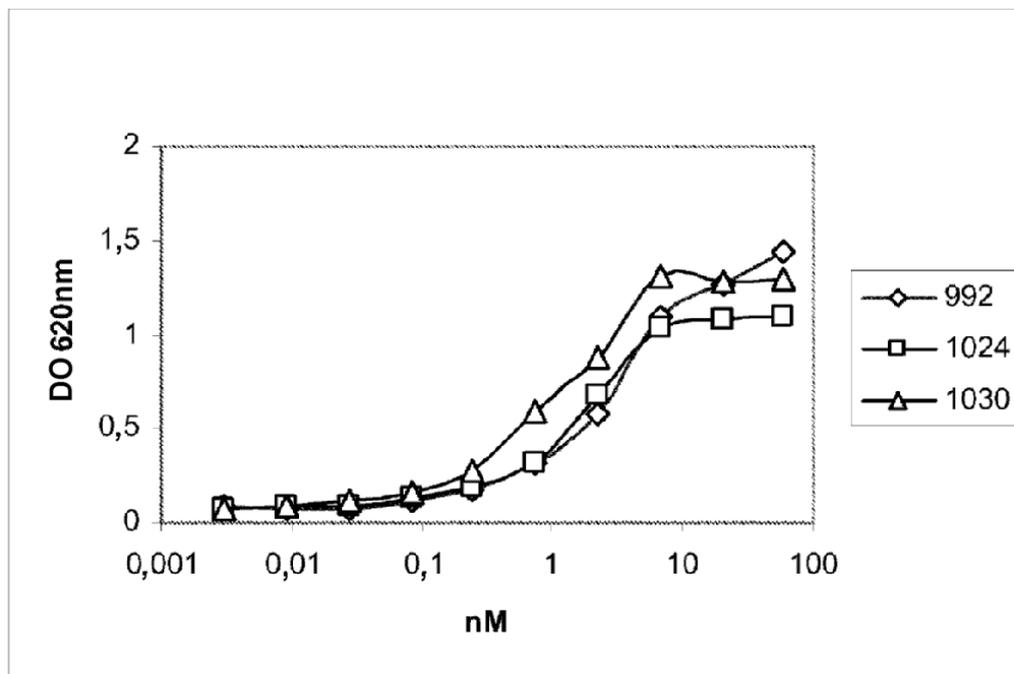


Fig. 31B

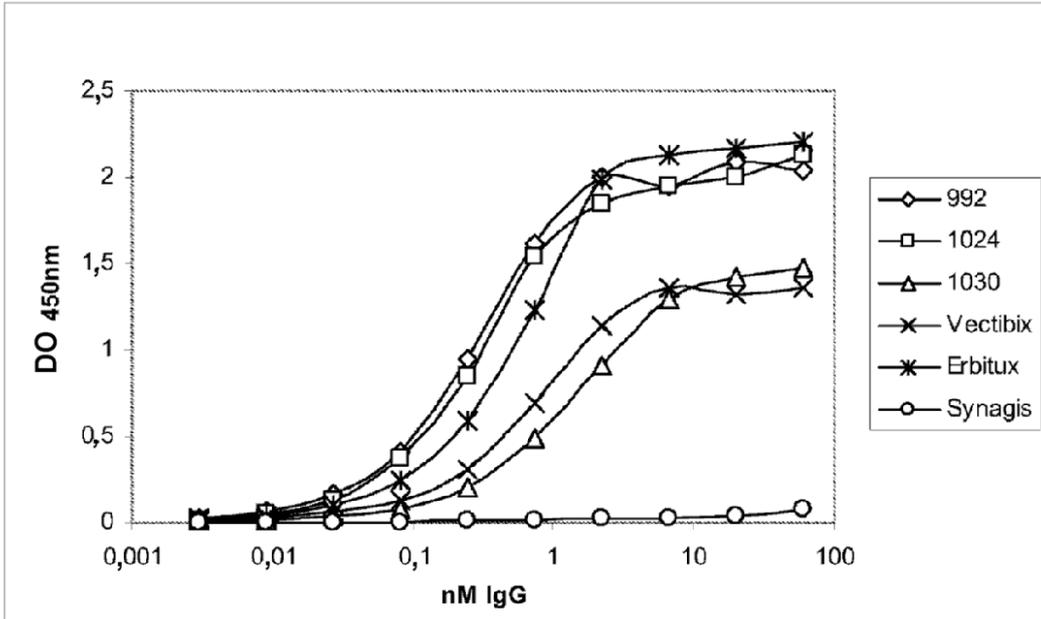


Fig. 32A

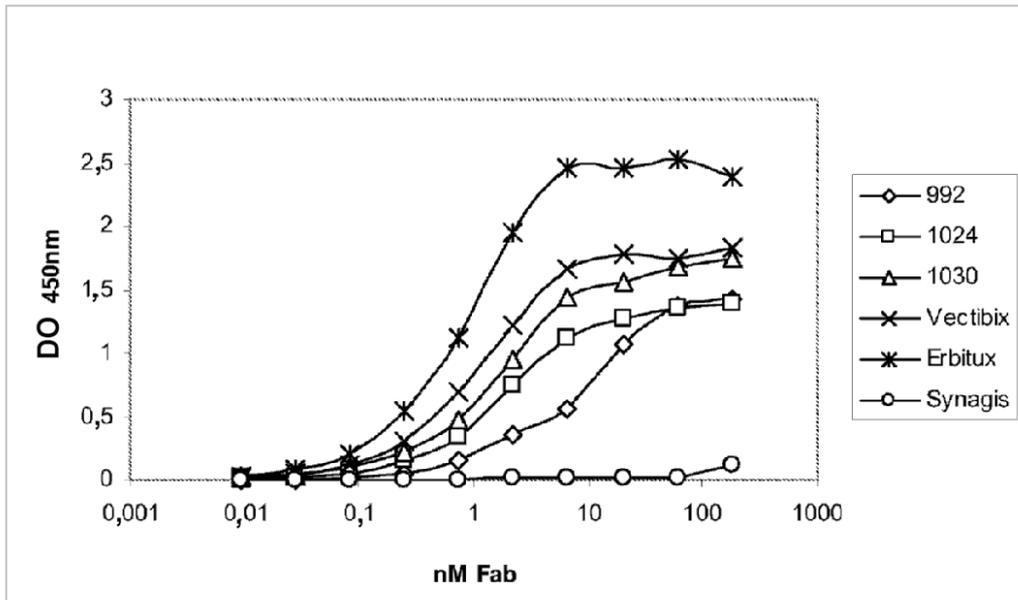


Fig. 32B

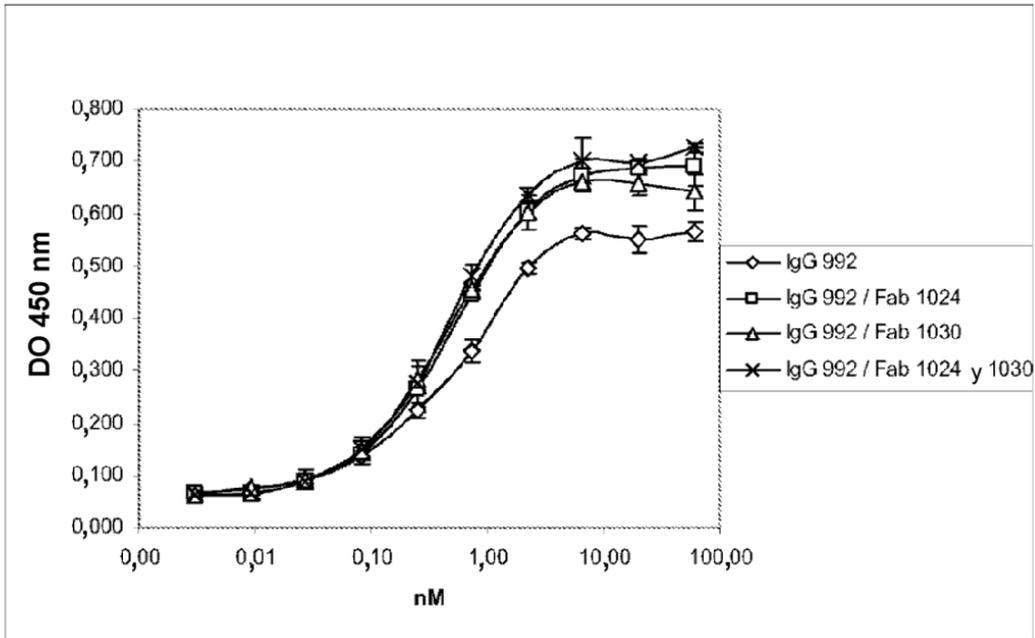


Fig. 33A

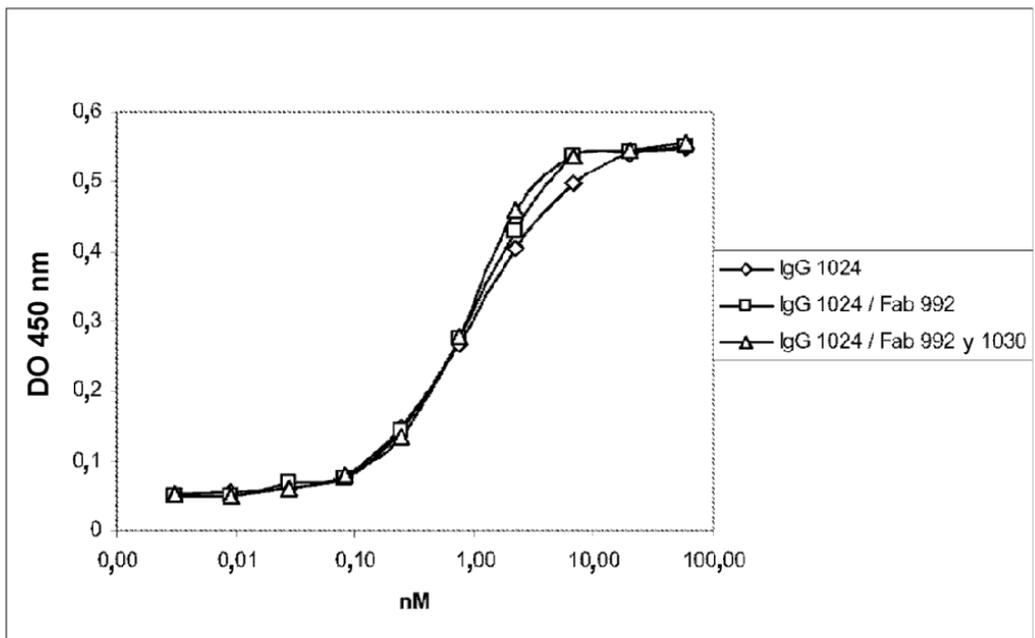


Fig. 33B

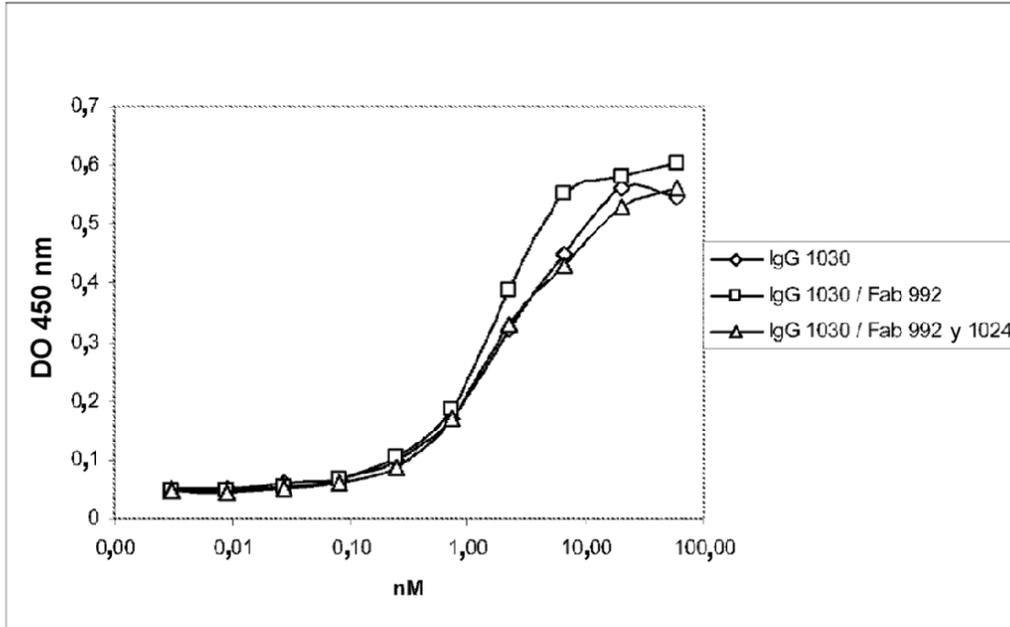


Fig. 33C

atgcgaccctccgggacggcggggcggcgcctcctggcgctgctggctggcctttgccccggagtgggctctggaggaaaa
 gaaagtttgccaaaggcaagagtaacaaaactcagcaggttgggaacttttgaagatcattttctcagcctccagaggatgttca
 ataactgtgaggtggctccttgggaatttggaaattacctcagtgccagaggaattatgatcttctccttcttaaagaccatccag
 gaggtggctggttatgtcctcatogccctcaacacagtgagggattcctttggaaaacctgcagatcatcagaggaaacat
 gtactatgaaaattcctatgccttagcagcttatacctaactatgatgcaaaataaaaccggaactgaaggagctgcccatgagaa
 acttacaggaaatcctgcctggcggcctgctgggttcagcaacaacccctgccctgtgcaacgtggagagcatccagtggcgggac
 atagtcagcagcaggtttctcagcaacatgtogattggacttcocagaaaccaactgggcagctgccccaaagtgtgatccaagctg
 tcccaatgggagctgctgggggtgcaggagaggagaactgccagaaaactgacccaaaatcatctgtgcccagcagtgctccgggc
 gctgcgcggcgaagtcctccagtgactgctgccacaaccagtgctgcggggctgcaacgggccccgggagagcagctgctg
 gtctgcccgaatccagagacgaagccagtgcaaggacacctgccccccactcatgctctacaacccccaccataccagat
 ggatgtgaaacccggagggaataacagcttgggtgccacctgctgagaagtgtcccccgttaattatgtggtgacagatcacg
 gctcgtgctccgagcctgcggggccgacagctatgagatggaggaagacggcctccgcaagtgtaaagaatgccaagggcct
 tgccgcaaaagtgttaattggaataggattgggtgaatttaagaacacactctccataaatgctacaaaatattaacacttcaa
 aaactgcacctccatcagtgggcagctccacatcctgcccgtggcatttaggggtgactccttcacacacactccgcctctgg
 atccacaggaactggatattctgaaaaccgtaaaaggaaatcacagggtttttgctgattcaggcttggcctgaaaacaggacg
 gacctccatgcttttgagaacctagaaatcatacgtggcaggacccaagcaacaaggcagtttctctctggcgtcgtcagcct
 gaacataacatccttgggattacgctcctcaaggagataagcgatggagatgtgataatttcaggaaacaaaaatgtgct
 atgcaaatacaataaactggaaaaactgtttgggacctccagtcagaaaaacaaaattataagcaacagaggtgaaaacagc
 tgoaaggccacggggccaggctgcctatgccttgtgctccccogagggtgctggggccgggagcccagggaactgctctcctg
 tcagaatgtcagccgggagagagaatgctggcaagtgcaacatcctggaggggagccaagggagtgtgtggagaactctg
 agtgcatacagtgctccccagaatgctgccccaggctcatgaacatccctgcacaggacggggaccagacaactgtatccag
 tgtgcccactacattgaegggccccactgcgtcaagacctgcccagcaggagtcatgggagaaaacaaacacctggctctggaa
 gtacgcagacggcggccactgtgtgccacctgtgccatccaaactgcaectacggatgcaactgggcccaggctctgaaggctgtg
 caaggaacgggcctaagatcccatccatgccactgggatggtggggccctcctcttctgctgctggtggtggccctggggatc
 ggctcttcatgogaaggcggccacatcgttcggaagcgcacactgcccggagctgctgcaggagaggagcttggaggcctct
 taogcccagtggaagctcccaaccaagctctcttgaggatcttgaaggaaactgaattcaagaagatcaaagtgctgggct
 ccggtgcttccgaaactgtgtataagggactctggatcccagaaggtagaaggttaaaatccctgctctatcaaggaaatta
 agagaagcaacatctccgaaagcccaacaggaaatcctcagatgaagcctacgtgatggccagcgtggacaacccccatgtgtg
 ccgctgctgggcatctgctcaccctccacogtgagctcattaegcagctcatgcctctgggctgctcctggactacgtcc
 yggaaacacaaggacaaatctggctcccagtaacctgctcaactgggtgtgtgcagattgcaaaggcatgaactacttggaggac
 cggcgtctgggtgcaccggcactggcagccaggaacgtaactgggtgaaaacgccacagcatgtcaagatccagatcttgggct
 ggcaaaactgctgggtgcagaagagaaagaataccatgcagaaggaggcaaaagtgcctatcaagtggatggcgttggaaatcaa
 ttttacaccgaatttataccaccagagtgatgtctggagctacgggggtgaccgtttgggagttgatgaccttggatccaag
 ccataatgacggaaatccctgccagcagatctcctccatcctggagaaaggagaacgctccccagccaccatagtaccat
 cgatgtctacatgatcatggccaagtgtggatgatagaagcagatagtcgccccaaagtccctgagttgatcattgaattct
 ccaaaatggcccagacccccagcctaccttggttatccagggggatgaaagaatgcaatttggccaagccctacagactccaac
 ttctaccgtgcccgtgatggatgaaagaagacatggacagcgtgggtgatgccgacaggtacctcatccacagcaaggcttctt
 cagcagccctccagtcacggactccctcctgagctctctgagtgcaactagcaacaattccactggtgcttgcattgata

Fig. 34A

gaaatgggctgcaaaagctgttccatcaaggaagacagcttcttacagcgatacagctcagaccccacaggcgcttgactgag
gacagcatagacgacaccttccctcccagtgccctgaatacataaaccagctctgttcccaaaagggcccgtggctctgtgcagaa
tctgtctatcacaatcagcctctgaacctgcccagcagagaccacactaccaggacccccacagcaccgcagtgaggca
accccagatctcaacactgtccagcccacctgtgtcaacagcacattcgacagccctgctcattgggcccagaaaggcagc
caccaaaattagcctggacaacctgactaccagcaggacttcttcccaaggaagcaagcaccaaaatggcatctttaaggctc
cacagctgaaaatgcagaatacctaagggctgcaccacaaaagcagtgaaatttattggagcatga

Fig. 34A (Cont.)

MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEKKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNCEV
VLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPLLENLQIIRGNMYYENSYALA
VLSNYDANKTGLKELPMRNLQEIILHGAVRFSNNPALCNVESTQWRDIVSSEFLSNMSMDF
QNHLSQCQKCDPSCPNGSCWAGAGEENCQKLTKIICAQQCSGRRCRGKSPSDCCHNQCAAGC
TGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCPPMLLYNPTTYQMDVNEPEGKYSFGATCVKCKPRNYV
VTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFDKTLGINATNIKHEK
NOTSISGDLHILPVAFRGDSFHTFPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAF
ENLEIIRGRTKQHGFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKL
FGTSSQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCGWPEPRDCVSCQNVSRGRECVDKCN
ILEGEPREFVENSECIQCHPECLPQVMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVM
GENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGTGPGLEGCARNGPKIPSIATGMVGAALLLVV
ALGIGLFMRRRHIVRKRTRLRRLQERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGS
GAFGTVYKGLWIPEGEKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLLEI
CLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRLVHRDLAA
RNVLVKTPQHVKITDFGLAKLLGABEKEYHAEGGKVFIKWMALESILHRIYTHQSDVWSY
GVTWELMTFGSKPYDGI PASEISSILEKGERLPQPPICTIDVYIMVCKWMI DADSRPK
FRELIIEFKMDARDPQRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVDDADEYLIPO
QGFSSPSTSRTPLLSSLSATSNNSTVACIDRNLQSCSICKEDSFLQRYSSDPTGALTED
SIDDTFLPVPEYINQSVPKRPAGSVQNPVYHNQPLNPAPSRDPHYQDPHSTAVGNPEYLN
TVQPTCVNSTFDSPAHWAQKGS HQISLDNPDYQQDFFPKEAKPNGIFKGS TAENAEYLRV
APQSSEFIGA

Fig. 34B

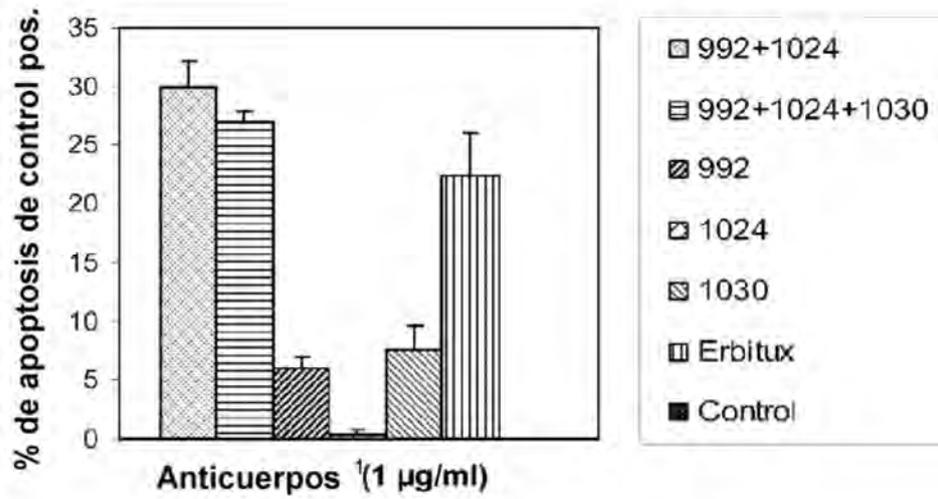


Fig. 35

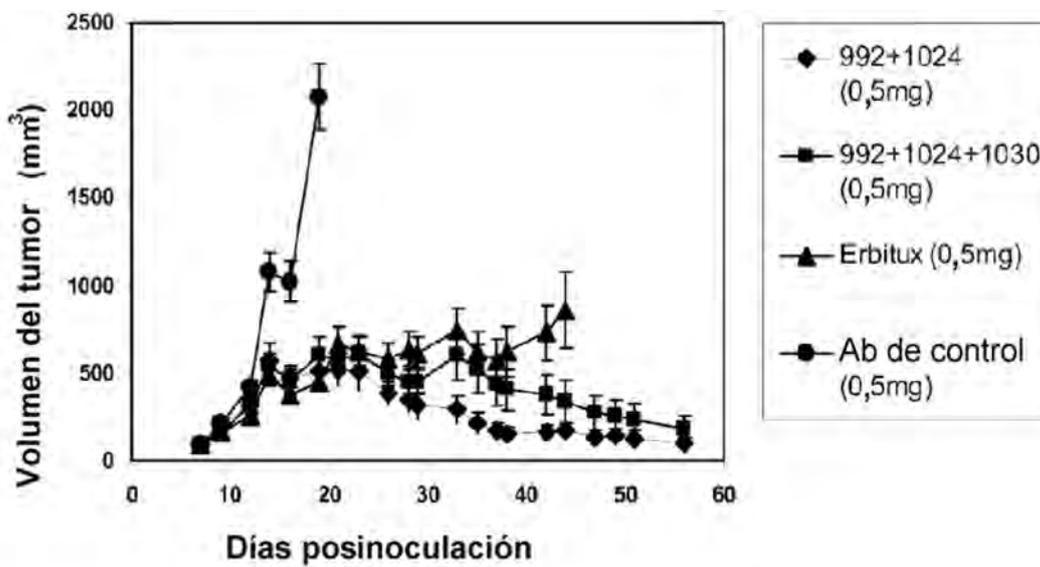


Fig. 36

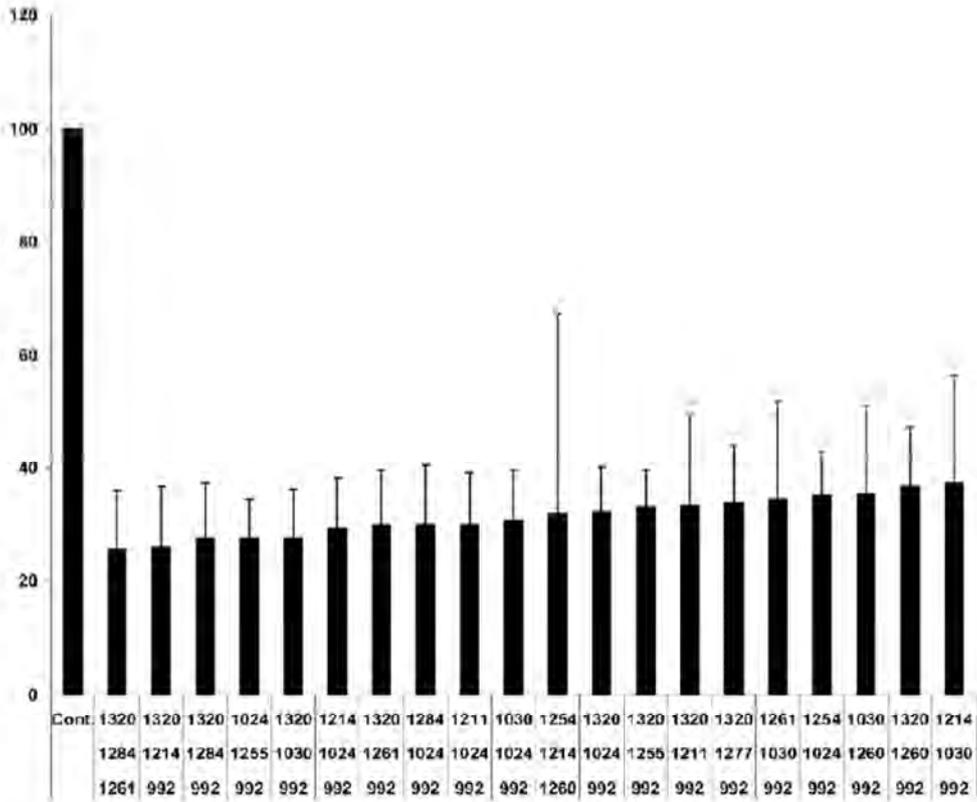


Fig. 37

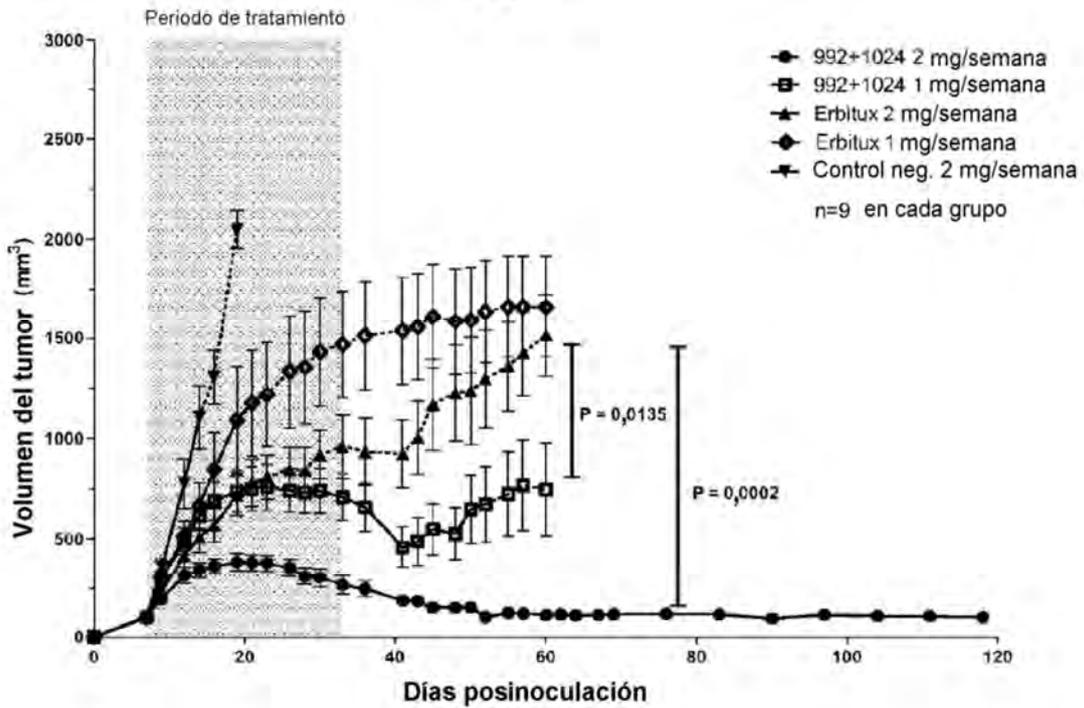


Fig. 38

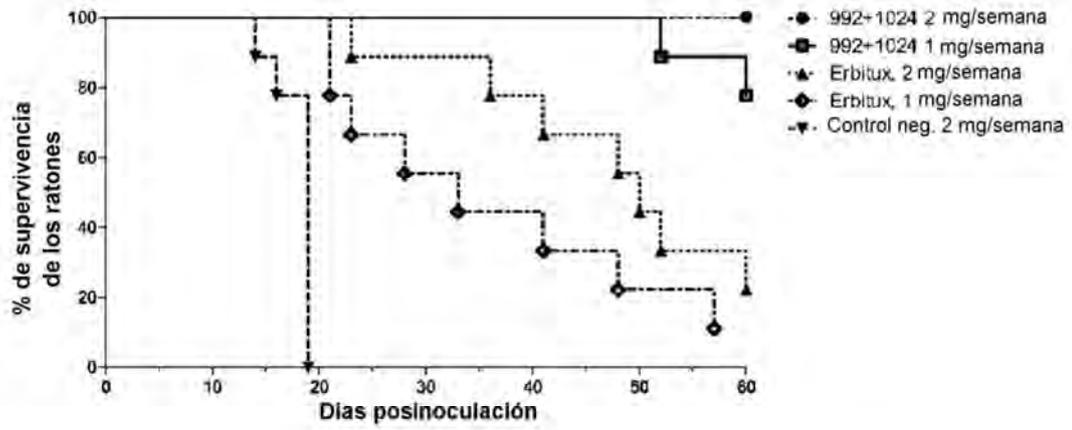


Fig. 39

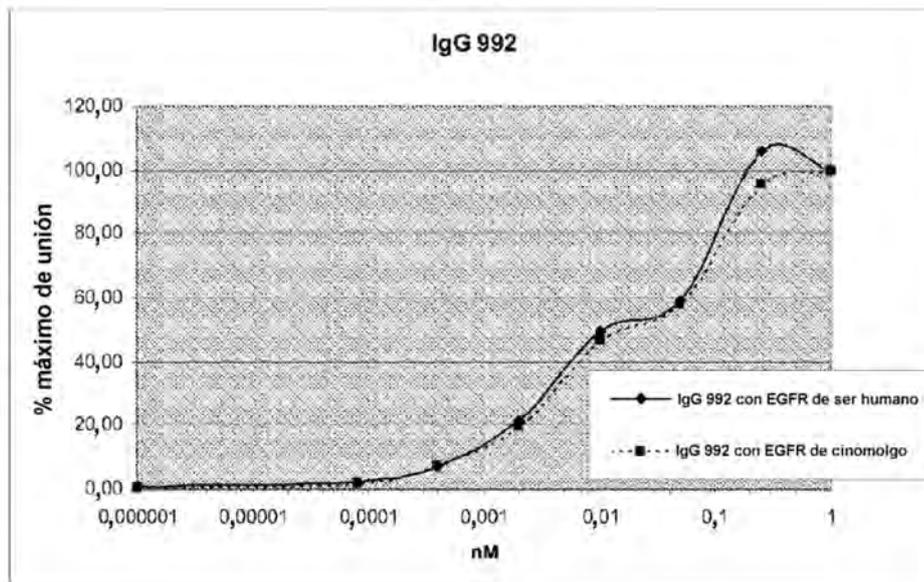


Fig. 40A

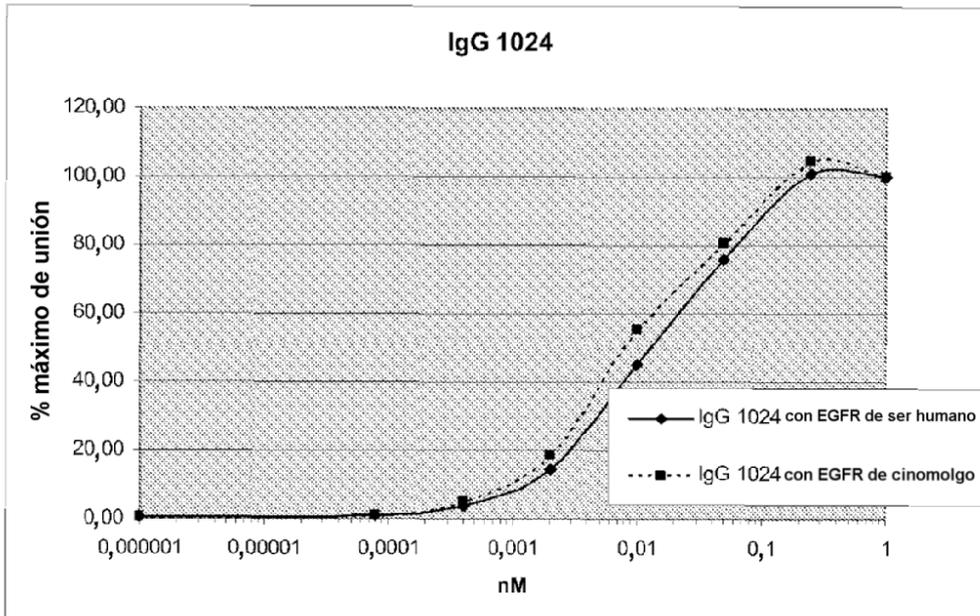


Fig. 40B

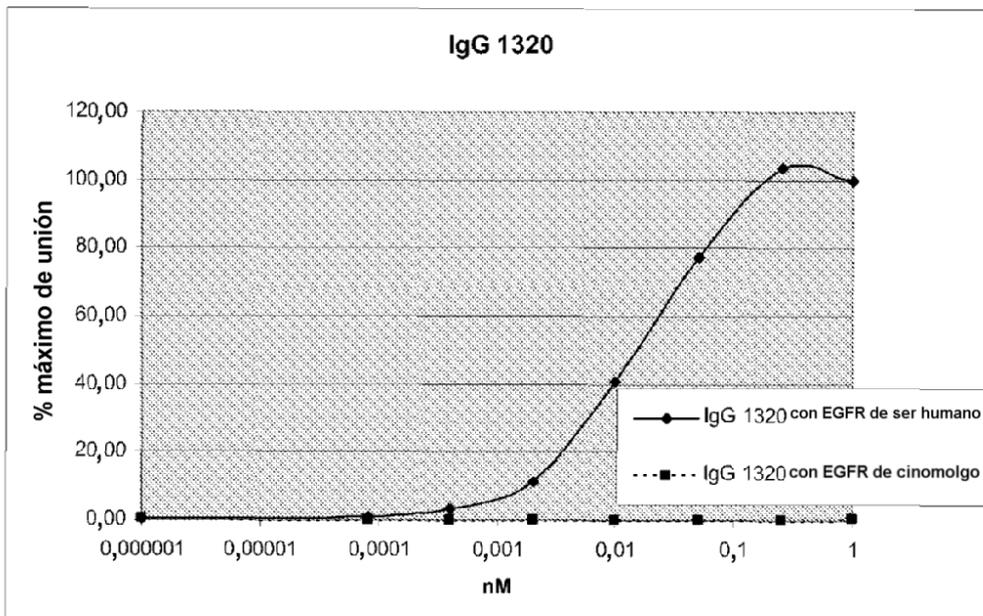


Fig. 40C

ES 2 582 386 T3

```

hu992VH      QVQLVQSGA-EVKKPGASVKVSCASGYFTFSYW---MHWVRQAPGGGLEWMMGI IYPGS 60
qui 992VH    EVQLQQPGS-ELVRPGASVKLSCKASGYFTFSYW---MHWVKQRPGGLEWIGNIYPGS 60
           :*** :*.*: *:* :*****:*****:***** * * * * *
hu992VH      RST--SYAQKFK-GRVTMTRDTSTSTIVMELSSLRSEDVAVYYCTRNGDYVSSGDAMDY 117
qui 992VH    RST--NYDEKFK-SKATLTVDTSSTAYMQLSLSLTSEDSAVYYCTRNGDYVSSGDAMDY 117
           ***_* :**: :*.*: * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
hu992VH      WGQGTLVTVS 127
qui 992VH    WGQGTISVTVS 127
           *****
hu992VL      DIQMTQSFSSLSASVGDRTVITCRASQDIGNY-----LAWYQQKPKGKPKLLIYYS-- 60
qui 992VL    DIQMTQTSSLSASLGDRVTIISCRPSQDIGNY-----LNWYQQKPKDGTVKLLIYYS-- 60
           ** * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * * * * * * * . . * * * * *
hu992VL      -----TLQSGVP-SRFSGSG-SGTDFTLTISSLQPEDVATYFCQHYNT----VPPTFGGGTKV 124
qui 992VL    -----RLHSGVP-SRFSGSG-SGTDFSLTINNVEQEDVATYFCQHYNT----VPPTFGGGTKL 124
           * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
hu992VL      EIK 127
qui 992VL    EIK 127
           ***

```

Fig. 41A

```

hu1024VH     QVQLVQSGA-EVKKPGASVKVSCASGYIFTSHW---MHWVRQAPGGGLEWMMGIWNPSS 60
qui 1024VH   QVQLQQPGA-ELVEPGGSVKLSCKASGYIFTSHW---MHWVKQRPGGLEWIGEINPSS 60
           *** * . * * * : * * . * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
hu1024VH     GRN--NYAQKFK-GRVTMTRDTSTSTAYMELSRLTSDDTAVYYCARYYGYDE-AMDYWGQG 121
qui 1024VH   GRN--NYNEKFK-SKATLTVDKSSSTAYMQPSSLTSEDSAVYYCVRYYGYDE-AMDYWGQG 121
           *** * * :**: :*.*: * * * * * : * * * * * : * * * * * : * * * * *
hu1024VH     TSVTVS 127
qui 1024VH   TLVTVS 127
           * * * * *
qui 1024VL   DIVMTQAAFPNPVTLGTSASISCRSSKLLHNSGITY-LYWYLQKPGQSPQLLIYQMS-- 65
hu1024VL     DIVMTQSPLSLPVPFGEPASISCRSSKLLHNSGITY-LDWYLOKPGQSPQLLIYQMS-- 65
           *****: . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
qui 1024VL   -----NLASGVP-DRFSSG--SGTDFTLRISRVEAEDVGVYCAQNLE----LPYTFGGGTKL 124
hu1024VL     -----NRASGVP-DRFSGSG--SGTDFTLKISRVEAEDVGVYCAQNLE----LPYTFGGGTKV 124
           * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
qui 1024VL   EIK 127
hu1024VL     EIK 127
           ***

```

Fig. 41B

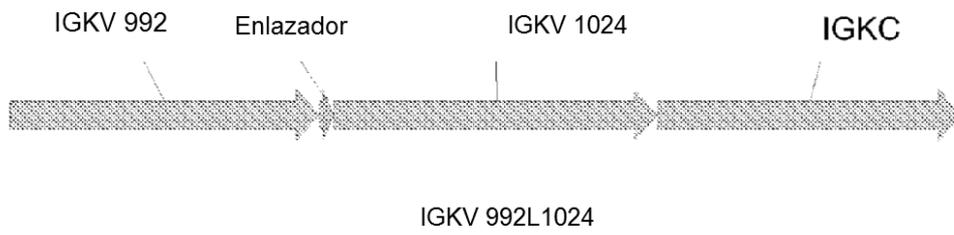
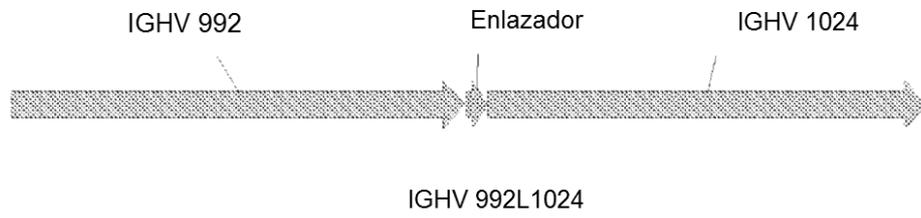


Fig. 42A

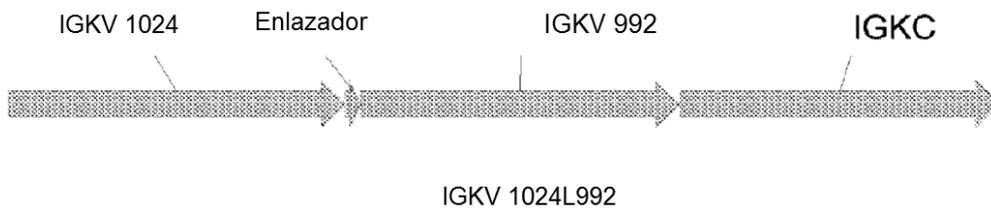
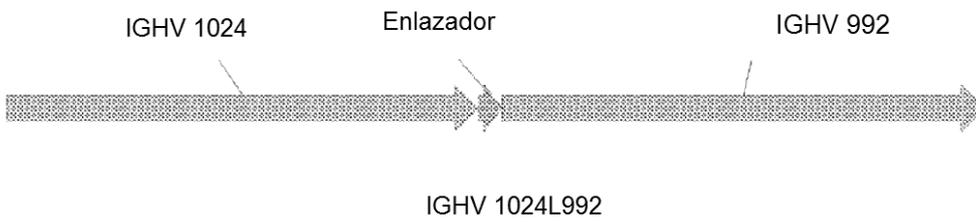


Fig. 42B