

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 592 883**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2009 PCT/KR2009/006380**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2011 WO11040668**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2009 E 09850100 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2483309**

54 Título: **Anticuerpos que se unen específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico**

30 Prioridad:

29.09.2009 KR 20090092401

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

02.12.2016

73 Titular/es:

**GREEN CROSS CORPORATION (100.0%)
303 Bojeong-dong Giheung-gu
Yongin-si, Gyeonggi-do 446-770, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, SE-HO;
CHANG, KI HWAN;
HONG, KWANG-WON;
SHIN, YONG-WON;
KIM, MIN-SOO;
LEE, HAE-WON;
SHIN, YONG NAM;
RYOO, KYUNG HWAN;
SEO, DONG HYUCK;
WON, JONG-HWA y
HUR, MIN-KYU**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 592 883 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

Anticuerpos que se unen específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

Antecedentes de la invención

10 El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es un proteína transmembrana de tipo I de 170 kDa y se sabe que se sobreexpresa en muchos tumores humanos, por ejemplo, carcinoma del pulmón, la mama, el colon, el estómago, el cerebro, la vejiga, la cabeza, el cuello, los ovarios y la próstata. Su sobreexpresión va acompañada frecuentemente por la producción de ligandos de EGFR, TGF- α (factor de crecimiento transformante- α) y EGF (factor de crecimiento epidérmico), y se confirmó que la unión de los ligandos a EGFR inducía proliferación celular y crecimiento tumoral. El bloqueo de la interacción entre tales ligandos y EGFR usando un anticuerpo contra EGFR puede inhibir por tanto el crecimiento tumoral, lo que se ha demostrado que es eficaz mediante experimentos que empleaban anticuerpos monoclonales contra EGFR.

15 El anticuerpo C225 (nombre comercial: Erbitux; ImClone, EE.UU.), que se usa actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento de cánceres colorrectales metastásicos, es un anticuerpo quimérico, que comprende las regiones variables de anticuerpos de ratón unidas a regiones constantes de IgG1 de anticuerpos humanos (se incluye en el mismo aproximadamente el 30% de la secuencia de aminoácidos de ratón). Se ha mostrado que C225 inhibe el crecimiento de células tumorales, la fosforilación de EGFR *in vitro* y la formación de tumores en un ratón desnudo, y también erradica completamente xenoinjertos de tumores humanos en ratones cuando se usan junto con un agente quimioterápico específico. Sin embargo, el anticuerpo tiene el problema de inducir reacciones inmunitarias en algunos (~10%) de los pacientes tratados con los mismos. Se dan a conocer anticuerpos anti-EGFR adicionales en el documento WO2005/090407. Por consiguiente, existe la necesidad de anticuerpos terapéuticos mejorados contra EGFR.

25 Los agentes terapéuticos para terapia dirigida constituyen aproximadamente el 50% de los fármacos anticancerígenos aprobados recientemente por la Food and Drug Administration (FDA) de los EE.UU. Tales anticuerpos proporcionan especificidad de diana y la capacidad de estimular específicamente el sistema inmunitario, lo que en combinación con las largas semividas biológicas de los mismos ha alertado a los investigadores de los potenciales terapéuticos de los mismos. Como resultado, la FDA de los EE.UU. ha aprobado recientemente el uso de varios anticuerpos para el tratamiento del cáncer. Los anticuerpos desempeñan papeles relevantes en muchos enfoques terapéuticos para enfermedades, lo que se ha vuelto incluso más atractivo con el reciente surgimiento de tecnologías que permiten el desarrollo de anticuerpos completamente humanos.

30 Los presentes inventores han intentado desarrollar anticuerpos novedosos, mejorados que tienen nuevas regiones determinantes de complementariedad (CDR) y han encontrado que tales anticuerpos pueden usarse en el tratamiento del cáncer bloqueando la transducción de señales mediada por EGFR.

Resumen de la invención

35 Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un anticuerpo novedoso que se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico.

40 Otro objeto de la presente invención es proporcionar ADN que codifican respectivamente para la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de dicho anticuerpo, y un vector de expresión que comprende el mismo.

Todavía otro objeto de la presente invención es proporcionar una línea celular transformada con el vector de expresión.

45 Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para tratar un cáncer, que comprende dicho anticuerpo.

La presente invención proporciona las siguientes realizaciones tal como se definen en los puntos 1-10:

1. Un anticuerpo que se une específicamente al receptor de factor de crecimiento epidérmico receptor (EGFR), que comprende:

50 a) una región variable de cadena pesada que comprende la región determinante de complementariedad (CDR) 1, CDR 2 y CDR 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente;

b) una región variable de cadena ligera que comprende CDR 1, CDR 2 y CDR 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente

- c) una región constante de cadena pesada; y
- d) una región constante de cadena ligera.
2. El anticuerpo del punto 1, que comprende:
- a) una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;
- 5 b) una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;
- e) una región constante de cadena pesada; y
- d) una región constante de cadena ligera.
3. Un ADN que codifica para una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende CDR 1, CDR 2 y CDR 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente; y un ADN que codifica para una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende CDR 1, CDR 2 y CDR 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente; en el que el anticuerpo se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).
- 10
4. El ADN del punto 3, que comprende el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 11 que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 12 que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 13 que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y que comprende el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 15 que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 16 que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 17 que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.
- 15
5. El ADN del punto 3, que codifica para una región variable de cadena pesada de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; y que codifica para una región variable de cadena ligera de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.
- 20
6. El ADN del punto 5, que comprende el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 14 que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; y que comprende el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 18 que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.
- 25
7. Un vector de expresión para expresar la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo que se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que comprende el ADN del punto 3.
- 30
8. El vector de expresión del punto 7, que es ER2-Heavy-pRC13 cuyo mapa se muestra en la figura 5; y que es ER2-Light-pKC12 cuyo mapa se muestra en la figura 6.
9. Una línea celular animal transformada con el vector de expresión del punto 7.
10. Una composición para tratar un cáncer, que comprende el anticuerpo del punto 1.
- Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo que se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que comprende: a) una región variable de cadena pesada que comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente; b) una región variable de cadena ligera que comprende CDR 1, CDR 2 y CDR 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente; c) una región constante de cadena pesada; y d) una región constante de cadena ligera.
- 35
- 40 Se da a conocer además en el presente documento un anticuerpo que se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que comprende: a) una región variable de cadena pesada que comprende CDR 1, CDR 2 y CDR 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente; b) una región variable de cadena ligera que comprende CDR 1, CDR 2 y CDR 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 5 y 6, respectivamente; c) una región constante de cadena pesada; y d) una región constante de cadena ligera.
- 45
- Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un ADN que codifica para la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo, y un vector de expresión que comprende el mismo.
- Según todavía otro aspecto de la presente invención, se proporciona una línea celular transformada con dicho vector de expresión.
- 50 Según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición para su uso en el tratamiento

de un cáncer, que comprende dicho anticuerpo.

Breve descripción de los dibujos

Los objetos anteriores y otros y características de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción de la invención, cuando se toman conjuntamente con los dibujos adjuntos, que muestran respectivamente:

- 5 figura 1: una fotografía de electroforesis (gel de agarosa al 1%) que presenta ADN que codifican respectivamente para las regiones variables de cadena pesada (VH) y variable de cadena ligera (VL) de la invención sintetizadas mediante PCR;
- 10 figura 2: un mapa de escisión del vector de presentación en fago, pKS4H, que comprende la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo de la invención;
- figura 3: un diagrama que muestra un procedimiento de selección de un anticuerpo a partir de una biblioteca de anticuerpos usando la técnica de biocribado;
- figura 4: secuencias de aminoácidos de los fragmentos variables de cadena sencilla (scFv) de los anticuerpos de la invención, ER2 y ER79;
- 15 figura 5: un mapa de escisión del vector de expresión para expresar la cadena pesada del anticuerpo humano de la presente invención, ER2-Heavy-pRC13 o ER79-Heavy-pRC13;
- figuras 6 y 7: mapas de escisión de vectores de expresión para expresar las cadenas ligeras de los anticuerpos humanos de la presente invención, ER2-Light-pKC12 y ER79-Light-pKC12;
- 20 figura 8: resultados de SDS-PAGE obtenidos para la cadena pesada y la cadena ligera expresadas a partir del transformante;
- figura 9: afinidades relativas de los anticuerpos humanos (ER2 y ER79), un anticuerpo quimérico (C225, Erbitux) y otro anticuerpo (ER414) frente al receptor del factor de crecimiento epidérmico;
- figura 10: un citómetro de flujo que presenta la unión de los anticuerpos de la invención con el receptor del factor de crecimiento epidérmico sobreexpresado en una línea celular de cáncer (A431);
- 25 figura 11: el efecto inhibitorio de los anticuerpos de la invención sobre la fosforilación del receptor del factor de crecimiento epidérmico; y
- figura 12: resultados de medición por resonancia de plasmón superficial que revelan los sitios de unión de los anticuerpos de la invención con el factor de crecimiento epidérmico y los del anticuerpo quimérico C225 (Erbitux).

Descripción detallada de la invención

30 A continuación en el presente documento, la presente invención se describe en detalle.

La presente invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que comprende a) una región variable de cadena pesada que comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1, 2 y 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente; b) una región variable de cadena ligera que comprende CDR 1, CDR 2 y CDR 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente; c) una región constante de cadena pesada; y d) una región constante de cadena ligera. Preferiblemente, el anticuerpo puede ser uno que comprende: a) una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; b) una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; c) una región constante de cadena pesada; y d) una región constante de cadena ligera.

40 Además, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que comprende: a) una región variable de cadena pesada que comprende CDR 1, CDR 2 y CDR 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente; b) una región variable de cadena ligera que comprende CDR 1, CDR 2 y CDR 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 5 y 6, respectivamente; c) una región constante de cadena pesada; y d) una región constante de cadena ligera. Preferiblemente, el anticuerpo puede ser uno que comprende: a) una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; b) una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; c) una región constante de cadena pesada; y d) una región constante de cadena ligera.

50 Los anticuerpos de la invención pueden ser preferiblemente anticuerpos humanos, y se caracterizan por el bloqueo de la transducción de señales inducida por el factor de crecimiento epidérmico (EGF).

Los anticuerpos que se unen específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico pueden seleccionarse preferiblemente mediante una modificación de un método de presentación en fago (Smith, Science, 228, 1315-1317, 1985; y Hoogenboom & Chames, Immunol Today, 21, 371-378, 2000). En el método de presentación en fago, se fusiona un gen (gen III) que codifica para una proteína de superficie de fago filamentoso (por ejemplo M13, Fd o F1) con un gen que codifica para un anticuerpo de interés, de ese modo se producen partículas de virus que tienen el anticuerpo fusionado expuesto sobre la superficie como una forma de anticuerpo-fago. Posteriormente, puede seleccionarse un anticuerpo de interés a partir de una biblioteca de fagos a través de la técnica de biocribado usando la alta especificidad y afinidad del anticuerpo y la alta propiedad infecciosa del fago (Burton & Barbas, Adv. Immunol., 57, 191-280, 1994; Winter *et al.*, Annu. Rev. Immunol., 12, 433-455, 1994; y Hoogenboom *et al.*, Immunotechnology, 4, 1-20, 1998). El vector de presentación en fago puede ser pKS4H (véase la patente coreana n.º 0635370) o pCANTAB5E, preferiblemente, pKS4H.

En la presente invención, se seleccionó un anticuerpo humano ER414 a partir de una biblioteca de fagos y se comprobó su afinidad y capacidad de neutralización contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (figuras 9 y 11). El anticuerpo ER414 tiene la capacidad de neutralización, pero su afinidad era 16 veces menor que la del anticuerpo disponible comercialmente, C225. Por consiguiente, se seleccionaron anticuerpos mejorados con afinidades similares a C225 usando el proceso de maduración de afinidad. Es decir, se generó una biblioteca a través de la aleatorización de aminoácidos de regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo seleccionado de manera primaria, se seleccionaron anticuerpos que tenían la afinidad madurada usando la técnica de biocribado, y finalmente se seleccionaron anticuerpos (ER2 y ER79) que tenían afinidades similares al anticuerpo C225 mediante el método de ELISA de competición.

En el caso del anticuerpo ER2, CDR 1, CDR 2 y CDR 3 de la región variable de cadena pesada tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente, y CDR 1, CDR 2 y CDR 3 de la región variable de cadena ligera tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente, como resultado del análisis de secuencias. Por otro lado, CDR 1, CDR 2 y CDR 3 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo ER79 tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente, y CDR 1, CDR 2 y CDR 3 de la región variable de cadena ligera tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 5 y 6, respectivamente.

Las regiones constantes de cadena pesada o las regiones constantes de cadena ligera de los anticuerpos de la invención pueden ser idénticos a los de un anticuerpo humano, y pueden ser preferiblemente aminoácidos que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 y 44, respectivamente.

La presente invención se refiere a un ADN que codifica para una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende CDR 1, CDR 2 y CDR 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente. Preferiblemente, el ADN puede comprender el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 11 que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 12 que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 13 que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

La presente invención se refiere a un ADN que codifica para una región variable de cadena pesada de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. Preferiblemente, el ADN puede comprender el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 14 que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

Además, la presente invención se refiere a un ADN que codifica para una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende CDR 1, CDR 2 y CDR 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente. Preferiblemente, el ADN puede comprender el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 15 que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 16 que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 17 que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

La presente invención se refiere a un ADN que codifica para una región variable de cadena ligera de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. Preferiblemente, el ADN puede comprender el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 18 que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

Además, la presente invención se refiere a un ADN que codifica para una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende CDR 1, CDR 2 y CDR 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 5 y 6, respectivamente. Preferiblemente, el ADN puede comprender el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 19 que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 16 que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 17 que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

La presente divulgación se refiere a un ADN que codifica para una región variable de cadena ligera de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. Preferiblemente, el ADN puede comprender el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 20 que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

- 5 La presente invención se refiere a un vector de expresión para expresar la región variable de cadena pesada del anticuerpo que se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que comprende el ADN que codifica para la región variable de cadena pesada del anticuerpo. Preferiblemente, el vector de expresión puede ser "ER2-Heavy-pRC13" o "ER79-Heavy-pRC13" cuyo mapa se muestra en la figura 5.

- 10 Específicamente, el vector puede prepararse insertando el fragmento de VH (1-a: ER2Ab-H o 1-b: ER79Ab-H) del anticuerpo seleccionado mediante procedimientos de maduración de afinidad en un vector adecuado, por ejemplo, el vector pRC13 (depósito n.º KCLRF-BP-00054; patente coreana n.º 523732).

- 15 La presente divulgación se refiere a un vector de expresión para expresar la región variable de cadena ligera del anticuerpo que se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que comprende el ADN que codifica para la región variable de cadena ligera del anticuerpo. Preferiblemente, el vector de expresión puede ser "ER2-Light-pKC12" cuyo mapa de escisión se muestra en la figura 6, o "ER79-Light-pKC12" cuyo mapa de escisión se muestra en la figura 7.

Específicamente, los vectores pueden prepararse insertando cada fragmento de VL (2-a: ER2Ab-L o 1-b: ER79Ab-L) de los anticuerpos seleccionados mediante procedimientos de maduración de afinidad en un vector adecuado, por ejemplo, el vector pKC12 (depósito KCLRF-BP-00054; patente coreana n.º 523732).

- 20 La presente divulgación se refiere a una línea celular animal transformada con el vector de expresión para expresar la región variable de cadena pesada del anticuerpo de la invención, y el vector de expresión para expresar la región variable de cadena ligera del anticuerpo de la invención. El vector de expresión para expresar la región variable de cadena pesada del anticuerpo de la invención puede ser preferiblemente ER2-Heavy-pRC13 o ER79-Heavy-pRC13, y el vector de expresión para expresar la región variable de cadena ligera del anticuerpo de la invención puede ser preferiblemente ER2-Light-pKC12 o ER79-Light-pKC12. La línea celular animal puede ser la línea celular CHO (ovario de hámster chino), HEK 293 o NSO, preferiblemente, la línea celular CHO (ovario de hámster chino).

Los anticuerpos según la presente invención pueden prepararse mediante lo cual la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera se combinan entre sí.

- 30 La afinidad de los anticuerpos de la invención por el antígeno puede medirse, por ejemplo, mediante el ELISA de competición (Kim *et al.*, Hybridoma, 20, 265-272, 2001). Tal como se muestra en la figura 9, la afinidad del anticuerpo ER2 de la presente invención es similar a la del anticuerpo C225, mientras que la afinidad del anticuerpo ER79 es dos veces menor que la del anticuerpo C225. Además, se demostró que los anticuerpos se unían al receptor del factor de crecimiento epidérmico sobreexpresado en una línea celular de cáncer usando un citómetro de flujo (FACS) (figura 10), y se confirmó que tenían la capacidad de neutralización a través del experimento de la inhibición de la fosforilación del receptor del factor de crecimiento epidérmico en una célula de cáncer de mama (figura 11). Por tanto, los anticuerpos de la presente invención pueden usarse como anticuerpo para tratar un cáncer inhibiendo la transducción de señales a través del receptor del factor de crecimiento epidérmico.

- 40 En vista del resultado, la presente invención proporciona una composición, preferiblemente composición farmacéutica, para tratar un cáncer, que comprende el anticuerpo. La composición puede comprender además al menos uno seleccionado del grupo que consiste en cisplatino, gemcitabina, doxorubicina, 5-FU, irinotecán y paclitaxel.

- 45 La composición contiene anticuerpo ER2 o ER79 o transformantes que contienen el mismo como principio activo e incluye adicionalmente uno o más componentes eficaces que tienen las mismas o similares funciones que dicho principio activo. Además del principio activo, la composición de la presente invención puede incluir uno o más portadores farmacéuticamente aceptables tales como solución salina, agua esterilizada, solución de Ringer, solución salina tamponada, disolución de dextrosa, disolución de maltodextrina, glicerol, etanol, liposoma y una mezcla que comprende uno o más de esos componentes. Si es necesario, puede añadirse adicionalmente un aditivo general tal como un antioxidante, un tampón y un agente bacteriostático. La composición de la presente invención puede formularse en diferentes formas incluyendo disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas para inyección, 50 píldoras, cápsulas, gránulos o comprimidos mezclando con diluyentes, agentes de dispersión, tensioactivos, aglutinantes y lubricantes. Puede mezclarse un anticuerpo específico de célula diana u otros ligandos con uno de dichos portadores que van a suministrarse a la célula diana. La composición puede prepararse además en formas adecuadas según los componentes siguiendo el método representado en Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA.

- 55 La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse por vía parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa, hipodérmica, peritoneal o local), y se prefiere la inyección intravenosa. En algunos casos de cáncer sólido, se prefiere más la administración local que favorece un acceso rápido y fácil del anticuerpo. La dosificación eficaz de la composición puede determinarse según el peso, la edad, el género, el estado de salud, la

dieta, la frecuencia de administración, el método de administración, la excreción y la gravedad de una enfermedad. Puede administrarse diaria o semanalmente una dosificación de una vez de la composición que contiene anticuerpo humano o transformante de aproximadamente 5 - 500 mg/m². La dosificación eficaz puede ajustarla un doctor que trata a pacientes con tumores malignos.

- 5 La composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse sola o junto con operación quirúrgica, terapia hormonal, quimioterapia y reguladores biológicos para tratar tumores malignos.

Los siguientes ejemplos se facilitan para el fin de ilustración sólo, y no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1: Aislamiento de ARN

- 10 Se construyó una biblioteca de anticuerpos con el fin de seleccionar anticuerpos que se unen específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico. Se usaron como una mezcla de ARN total de médula ósea humana, ARN total de timo humano, ARN total de bazo humano y ARN de células B. Todos los ARN, excepto el ARN de células B humanas se adquirieron de Clontech (EE.UU.) y el ARN de células B humanas se aisló tal como sigue:

- 15 Se diluyeron 50 ml de sangre extraída de un adulto sano mezclando con 50 ml de HBSS (solución salina equilibrada de Hank; Sigma, EE.UU.) en una razón de mezclado de 1:1, y se almacenaron hasta su uso. Se colocaron 10 ml de Histoprep (Sigma) en un tubo de 50 ml y se añadieron 20 ml de sangre diluida. Se centrifugó la mezcla a 3.000 rpm para aislar glóbulos blancos. Se mezclaron 2 ml de los glóbulos blancos aislados con 6 ml de HBSS y se centrifugaron a 1.000 rpm. Se mezclaron 100 µl de los glóbulos blancos con 1 ml de Trizol (Life Technology, EE.UU.) para aislar ARN.

- 20 Mientras, se diluyó el ARN aislado con agua destilada y se midió la absorbancia a 260 nm para calcular su cantidad (1,8 µg/µl; espectrofotómetro Ultraspec 2000 UV-VIS, GE, EE.UU.). El procedimiento detallado es tal como sigue:

- 25 Se añadió 1 ml de Trizol a 100 µl de glóbulos blancos, se agitó bien y se dejó a temperatura ambiente durante 5 min. Entonces, se añadieron 200 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente durante 15 s y se dejó durante 3 min. Posteriormente, se centrifugó la mezcla en unas condiciones de 2~8°C, 15 min y 15.000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Se añadieron 500 µl de alcohol isopropílico y se mezcló bien, y se dejó a temperatura ambiente durante 10 min. Entonces, se centrifugó la mezcla a 2~8°C y 15.000 rpm durante 5 min para retirar el sobrenadante. Se añadió a la misma 1 ml de etanol al 75% y se centrifugó la mezcla en unas condiciones de 2~8°C, 5 min y 15.000 rpm para retirar el etanol, y se secó el sedimento de ARN a temperatura ambiente durante 5 min. Se añadieron al mismo 150 µl de agua destilada para suspender el sedimento de ARN, y se midió la absorbancia de la suspensión a 260 nm. Se almacenó el resto a -20°C.

30 Ejemplo 2: Amplificación de genes de anticuerpos

- 35 Se mezclaron 1 µg de ARN aislado en el ejemplo 1 y 1 µl de pd(T)₁₂₋₁₈ (0,5 µg/µl) con agua destilada para obtener un volumen final de 12,5 µl. Se hizo reaccionar la mezcla a 70°C durante 2 min y se enfrió usando hielos. Entonces, se añadieron al mismo tampón de reacción 5X, mezcla de dNTP 10 mM, inhibidor de ARNasa recombinante y transcriptasa inversa de VLMM (Clontech, EE.UU.) para obtener un volumen final de 20 µl, seguido por la reacción a 42°C durante 1 h a 95°C durante 5 min para sintetizar ADNc. Se llevó a cabo la reacción de PCR usando LiquiMix QM Premix, Magenta (Neurotics Inc., Corea), 4 µl de ADNc como molde, 19 µl de agua destilada y 1 µl de cebadores diseñados para unirse de manera homogénea a scFv, región variable de cadena ligera y región variable de cadena ligera (kappa y lambda), respectivamente. Los cebadores usados en PCR y sus secuencias de nucleótidos se muestran en la tabla 1.

40 <Tabla 1>

Cebadores usados en la reacción de PCR

Cebadores	Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO.
scFv-directo	5'-GTTGTTCCCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCC-3'	21
scFv-inverso	5'-GAGTCATTCTCGACTTGCGGCCGCACGTTT-3'	22
scFv-inverso	5'-GAGTCATTCTCGACTTGCGGCCGCACC-3'	23
VH1-directo	5'-CAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGG-3'	24
VH3-directo	5'-CAGCCGGCCATGGCCSAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGG-3'	25
VH4-directo	5'-CAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGC-3'	26

VH-inverso	5'-CGATCCGCCACCTCCGGAGCCACCTCCGCCTGAACCGC CTCCACC-3'	27
VK1/3A- directo	5'-GGTGGCTCCGGAGGTGGCGGATCGGACATCCAGATGACC CAGTCTCCA-3'	28
VK1/3B- directo	5'-GGTGGCTCCGGAGGTGGCGGATCGGAAATTGTGTTGACGC AGTCTCCA-3'	29
VK2-directo	5'-GGTGGCTCCGGAGGTGGCGGATCGGATATTGTGATGACC CAGACTCCAATC-3'	30
JK_A- inverso	5'-TCGACTTGCGGCCGCACGTTTGTATWTCCACYTTGGTCCC-3'	31
JK_B- inverso	5'-TCGACTTGCGGCCGCACGTTTGTATCTCCASCTTGGTCCC-3'	32
JK_C- inverso	5'-TCGACTTGCGGCCGCACGTTTAAATCTCCAGTCGTGTCCC-3'	33
VL_A- directo	5'-GGTGGCTCCGGAGGTGGCGGATCGCAGTCTGYSCTGAC TCAGCCACCC-3'	34
VL_B- directo	5'-GGTGGCTCCGGAGGTGGCGGATCGTCCTATGAGCTGACWC AGCCACCC-3'	35
JL_A- inverso	5'-TTCTCGACTTGCGGCCGCACCTAGGACGGTSASCTTGGTCCC-3'	36
JL_B- inverso	5'-TTCTCGACTTGCGGCCGCACCGAGGACGGTCAGCTGGGTGCC-3'	37

La reacción de PCR se llevó a cabo a 95°C durante 5 min, 55°C durante 2 min, 72°C durante 2 min con 30 ciclos, finalmente 72°C durante 15 min.

Se identificaron ADN de anticuerpo amplificados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,2% (figura 1). Tal como se muestra en la figura 1, se obtuvieron bandas de 350 pb de bandas de ADN correspondientes a regiones variables de las cadenas pesada y ligera (kappa y lambda). En la figura 1, M se refiere a un marcador de tamaño, VH a región variable de cadena pesada (carril 1: región variable de cadena pesada tipo I; carril 2: región variable de cadena pesada tipo III; y carril 3: región variable de cadena pesada tipo IV), VL a región variable de cadena ligera (carril 4: región variable de cadena ligera 1/3 κ; carril 5: región variable de cadena ligera 2 κ; y carril 6: región variable de cadena ligera λ).

10 Ejemplo 3: Digestión con enzimas de restricción de ADN de anticuerpo

Se digirieron VH y VL (kappa y lambda) preparadas en el ejemplo 2 con las enzimas de restricción SfiI/BspEI y BspEI/NotI, respectivamente, y se aislaron los fragmentos digeridos a partir de un gel de agarosa al 1,2% y se purificaron usando el kit Qiagen.

Ejemplo 4: Ligamiento de los ADN de anticuerpo y preparación de bibliotecas

15 Se digirió el vector de presentación en fagos, pKS4H (Green cross Corp., Corea, véase la patente coreana n.º 0635370), usando una enzima de restricción, SfiI/BspEI, y se separó usando electroforesis en gel de agarosa al 1,2%, seguido por purificación usando el kit Qiagen. Se mezclaron 30 µg de pKS4H con 3 µg de VH preparada en el ejemplo 3, y se añadió a los mismos ADN ligasa de T4 (New England BioLabs, EE.UU.), seguido por la reacción durante la noche a 25°C. Se purificó la mezcla de ligamiento usando el kit Qiagen y se transformó en *E. coli* XL1-blue (Stratagene, EE.UU.) mediante electroporación. Se cultivó el transformante en 100 ml de medio durante la noche y se aisló el plásmido. Se designó el plásmido como "pKS4H-VH-ΔVL".

25 Se digirió el plásmido, pKS4H-VH-ΔVL con una enzima de restricción, BspEI/NotI, y se purificó tal como se describió anteriormente. Entonces, se mezclaron 30 µg del plásmido pKS4H-VH-ΔVL con 3 µg de ADN de PCR de VL y ADN ligasa de T4 (New England BioLabs, EE.UU.), y se hizo reaccionar durante la noche a 25°C. Se purificó la mezcla de ligamiento usando el kit Qiagen y se transformó en *E. coli* XL1-blue mediante electroporación. Se cultivó el transformante en 100 ml de medio que contenía carbenicilina y tetraciclina a 37°C durante 2 horas. Entonces, se inoculó el fago M13 cooperador (Stratagene, EE.UU.) al medio y se cultivó durante 16 h para preparar una biblioteca de fagos tal como se notifica en Engberg *et al* (Mol. Biotechnol., 6, 287-310, 1995). Mientras, se aisló un plásmido de *E. coli*, y se designó como "pKS4H-VH-VL". El mapa de escisión del plásmido se representa en la figura 2.

Ejemplo 5: Selección de anticuerpos que se unen al receptor del factor de crecimiento epidérmico

Se seleccionaron anticuerpos que se unen a EGFR mediante una modificación de la técnica de cribado (Engberg *et al.*, Mol. Biotechnol., 6, 287-310, 1996; y Kim *et al.*, Gene, 241, 19-25, 2000). Específicamente, se diluyó EGFR (Sigma, EE.UU.) con PBS y se recubrió sobre cada inmunotubo (NUNC, Dinamarca). Entonces, se añadió la biblioteca de fagos preparada en el ejemplo 4 al inmunotubo recubierto y se hizo reaccionar. Se desprendieron los fagos que se unieron a EGFR usando 0,1 M de tampón glicina (pH 2,0). Posteriormente, se infectó *E. coli* XL1-blue con los fagos y se añadió un fago cooperador. Se incubó la *E. coli* durante la noche a 37°C y se añadió a la misma una disolución que contenía PEG 8.000 al 20% y NaCl al 15%. Entonces, se recogieron los fagos precipitados (rescate de fagos) y se hicieron reaccionar de nuevo los fagos en el inmunotubo recubierto con EGFR y se repitió el procedimiento 4 veces (cribado). A través del procedimiento, se seleccionaron anticuerpos humanos que se unen a EGFR, ER2 y ER79. El procedimiento de selección de anticuerpos humanos usando bibliotecas de presentación en fagos se representa en la figura 3.

Cada colonia de bibliotecas que completó un cribado de 4 veces se incubó en 2 ml de medio, según el método conocido (Kim *et al.*, Gene, 241, 19-25, 2000), y se indujo la expresión de anticuerpos mediante tratamiento de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido). Se midió la inducción de anticuerpos mediante ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) usando una placa de 96 pocillos recubierta con EGFR.

Ejemplo 6: Análisis de secuencia de anticuerpos seleccionados

Se incubaron colonias que secretan los anticuerpos humanos ER2 y ER79 seleccionados en el ejemplo 5 durante la noche en 10 ml de medio LB que contenía 50 µg/ml de carbenicilina y se aislaron de las mismas plásmidos recombinantes usando el minikit de plásmidos Qiagen (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.). Se digirieron los plásmidos con SfiI/NotI, se identificó la inserción de fragmentos de anticuerpos mediante una electroforesis en gel de agarosa. Se analizó la secuencia de ADN de scFv insertada en el plásmido.

Se usó p033 de SEQ ID NO: 38 como cebador de secuenciación y se analizaron las secuencias en Genotech (Daejeon, Corea). Se tradujeron las secuencias de ADN de scFv de ER2, ER79 y M96 (anticuerpo de ratón) en aminoácidos usando el programa basado en la web (www.expasy.org: herramienta de traducción de ADN en proteínas), y las secuencias de aminoácidos traducidas se muestran en la figura 4. En la figura 4, M96, ER2 y ER79 se refieren a los aminoácidos de scFv de M96 (anticuerpo de ratón) y ER2 y ER79 de la presente invención, respectivamente. Tal como se muestra en la figura 4, los anticuerpos humanos ER2 y ER79 tenían una secuencia de aminoácidos diferente.

Ejemplo 7: Construcción de vectores de expresión

Con el fin de convertir los fragmentos de anticuerpo en inmunoglobulinas intactas, se usaron los vectores de expresión de anticuerpos, pRC13 y pKC12 (plásmidos para la inserción de una región variable de un anticuerpo humano contra un antígeno de superficie del virus de la hepatitis B; patente coreana n.º 523732; depósito n.º KCLRF-BP-00054).

Se insertó cada fragmento de VH en el sitio de HindIII y Apal del vector de expresión de cadena pesada, pRC13. Tal como se muestra a modo de ejemplo en la figura 5, los ADN que codifican para las regiones variables de cadena pesada (VH) de los anticuerpos humanos ER2 y ER79 se amplificaron mediante PCR usando los cebadores respectivos de SEQ ID NO: 39 y 40, se digirieron con HindIII/Apal y se insertaron en pRC13 que se digirió con las mismas enzimas de restricción. El vector recombinante se designó "ER2-Heavy-pRC13" o "ER79-Heavy-pRC13". Los cebadores usados se muestran en la tabla 2.

<Tabla 2>

Cebadores usados en PCR

Cebadores	Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO.
VH-directo	5'-GGAGACCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTA ACGGCCGCCAGTGTGCTGGAA-3'	39
VH-inverso	5'-GAAGACCGATGGGCCCCTTGGTGGAGGCTGAGGAGACGG TGAC-3'	40

Mientras, se insertó cada fragmento de VL en el sitio de NheI y Apal del vector de expresión de cadena ligera, pKC12. Tal como se muestra a modo de ejemplo en las figuras 6 y 7, se amplificó cada ADN que codifica para la región variable de cadena ligera (VL) de los anticuerpos humanos ER2 y ER79 mediante PCR usando los cebadores respectivos de SEQ ID NO: 41 y 42, se digirió con NheI/Apal y se insertó en pKC12 que se digirió con las mismas enzimas de restricción. El vector recombinante se designó "ER2-Light-pKC12" o "ER79-Light-pKC12". Los cebadores usados se muestran en la tabla 3.

<Tabla 3>

Cebadores usados en PCR

Cebadores	Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO.
VL-directo	5'-TAGGGAGACCCGCTAGCGGAGCAAGATGGATTCA GGCCAGGT-3'	41
VL-inverso	5'-TATAGAATAGGGCCCCCCTCGAGGTGACCTAAC CTCTCCCT-3'	42

Ejemplo 8: Construcción de líneas celulares animales que secretan anticuerpos

Se incubaron 2×10^5 células CHO (ovario de hámster chino) en un frasco T-25 (NUNC, Dinamarca) lleno con medio α -MEM (Life Technologies, EE.UU.) que contenía FBS al 10% (Life Technologies, EE.UU.), 24 horas antes de la transformación. La incubación se llevó a cabo en un incubador a 37°C en presencia de 5% de CO₂ hasta que la confluencia alcanza el 50%. Al día siguiente, se añadieron 30 μ g de Lipofectin (Life Technologies, EE.UU.) a 1,5 ml de opti-MEM (Life Technologies, EE.UU.) y se dejó sin perturbaciones a temperatura ambiente durante 90 min. Tras 90 min, se mezcló el medio con el medio que contenía ER2-Heavy-pRC13, ER2-Light-pKC12, ER79-Heavy-pRC13 y ER79-Light-pKC12, respectivamente, para que reaccionara a temperatura ambiente durante 15 min. Durante la reacción, se separaron del medio las células para la transformación y se lavaron tres veces con PBS. A las células lavadas, se añadió la mezcla de reacción para su incubación. Tras 6 horas, se retiró la mezcla de reacción y se añadió medio α -MEM para su incubación durante 48 horas. Las células incubadas durante 48 horas se trataron con tripsina (Life Technologies, EE.UU.) para que se desprendieran del frasco, se diluyeron con medio α -MEM y se subcultivaron en una placa de 96 pocillos (NUNC, Dinamarca). En ese momento, el medio α -MEM no contiene ribonucleósidos ni desoxirribonucleósidos, mientras que contiene el 10% de FBS dializado (Life Technologies, EE.UU.) y 550 μ g/ml de G418 (Sigma, EE.UU.). Se reemplazó el medio por un nuevo medio cada dos días. Se recogió el sobrenadante de cultivo que formaba colonias para ELISA y se transfirieron las células seleccionadas a una placa de 12 pocillos. Se transfirieron las células a una placa de 6 pocillos si las células crecían bien en la placa de 12 pocillos, y se trataron con metotrexato (MTX, Choongwae Pharma Corporation, Corea) si las células crecían bien en la placa de 6 pocillos. La concentración inicial de MTX fue de 20 nM y se aumentó hasta 80 nM, 320 nM y 1 μ M según el crecimiento de las células. Se seleccionaron las líneas celulares que sobrevivieron a una concentración de 1 μ M y que tenían una alta cantidad de secreción de anticuerpos, y se cultivaron en masa. El cultivo en masa se llevó a cabo en un incubador con 65 rpm, 5% de CO₂ y 37°C, usando un frasco centrifugador y medio libre de suero. Se cultivaron las líneas celulares (10^8 células) en un frasco de 250 ml lleno con 100 ml de medio libre de suero. Cuando el número de células fue del doble, se recogieron el sobrenadante y las células mediante centrifugación a 1.000 rpm durante 5 min, respectivamente. Se cultivaron de nuevo las células recogidas en un frasco de 500 ml con 200 ml de medio. Cuando el número de células fue del doble, se separaron las células y se transfirieron a un frasco centrifugador de 3 l lleno con 1 l de medio. Se añadió a las mismas butirato de sodio (Aldrich, EE.UU.) hasta una concentración final de 2 mM, se cultivaron las células durante 5 días y se recogió el sobrenadante del medio. De todos los sobrenadantes recogidos mediante cultivo en los frascos centrifugadores, se purificaron los anticuerpos usando una columna de A-agarosa de proteínas (Amersham Pharmacia Biotech, EE.UU.) y se analizaron usando electroforesis en SDS-PAGE.

Tal como se muestra en la figura 8, se observaron aproximadamente 50 kd de banda de cadena pesada y 25 kd de banda de cadena ligera, lo que indica que los anticuerpos indudablemente se habían producido.

Ejemplo 9: Medición de la afinidad de anticuerpos

Se determinaron las afinidades de los anticuerpos obtenidos en el ejemplo 8 con respecto a EGFR mediante un método de ELISA de competición (Kim *et al.*, Hybridoma, 20, 265-272, 2001) y los resultados se muestran en la figura 9. El procedimiento resumido es tal como sigue:

(1) Determinación de la concentración óptima de anticuerpos

A. Preparación de una placa

Se añadieron a cada pocillo de una placa 100 μ l de EGFR (Sigma, EE.UU.) a una dilución de 2 μ g/ml en PBS y se incubaron durante la noche a 4°C. Se lavó cada pocillo de la placa una vez con PBST, se añadieron a cada pocillo 300 μ l de disolución de BSA-PBS al 1% y se almacenaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

B. 1ª reacción

Se añadieron a cada pocillo de la placa 100 μ l de cada anticuerpo purificado (0,5 μ g/ml), se hicieron reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente y se lavaron 4 veces con PBST.

C. 2ª reacción

Se añadieron a cada pocillo 100 µl de conjugado de IgG de cabra anti-ser humano (específico de Fab)-peroxidasa (Sigma) a una dilución de 1:5000 en BSA-PBS al 1%, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron cuatro veces con PBST.

5 D. Reacción de sustrato

Se añadieron a cada pocillo 100 µl de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, sistema de sustrato de peroxidasa Microwell (KPL, MD, EE.UU.) y se midió el valor de D.O. a 405 nm. Se determinaron las concentraciones óptimas de anticuerpos como 1/2 de las concentraciones a las que aparece la unión máxima.

(2) ELISA competitivo

10 A. Preparación de una placa

Se añadieron a cada pocillo de una placa 100 µl de EGFR (Sigma, EE.UU.) a una dilución de 2 µg/ml en PBS y se incubaron durante la noche a 4°C. Se lavó cada pocillo una vez con PBST, se añadieron a cada pocillo 300 µl de disolución de BSA-PBS al 1% y se almacenaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

B. 1ª reacción

15 Se diluyeron 2 µg de EGFR en dos veces y se añadieron a cada pocillo de la placa 10 µl del EGFR diluido. Entonces se añadieron a cada pocillo 90 µl del anticuerpo diluido hasta la concentración óptima determinada en (1), se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente y se lavaron 4 veces con PBST.

C. 2ª reacción

20 Se añadieron a cada pocillo 100 µl de conjugado de IgG de cabra anti-ser humano (específica de Fab)-peroxidasa (Sigma) a una dilución de 1:5000 en BSA-PBS al 1%, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron cuatro veces con PBST.

D. Reacción de sustrato

25 Se añadieron a cada pocillo 100 µl de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, sistema de sustrato de peroxidasa Microwell (KPL, MD, EE.UU.) y se midió el valor de D.O. a 405 nm. Se determinó la concentración de EGFR que inhibe el 50% de la unión máxima (valor de D:O. en la que no existe EGFR competitivo) como Kd.

Tal como se muestra en la figura 9, el anticuerpo humano ER2 mostró una afinidad similar y ER79 mostró aproximadamente el 63% de afinidad, en relación con la de un anticuerpo quimérico (C225) y un anticuerpo de ratón (M96). Además, las afinidades de los anticuerpos de la invención fueron superiores que las de ER414 (un anticuerpo humano antes del biocribado).

30 Ejemplo 10: Verificación de la unión de los anticuerpos de la invención a EGFR en una línea celular de tumor

Con el fin de verificar que los anticuerpos de la invención, ER2 y ER79, se unen a EGFR sobreexpresado en una línea celular de tumor, se usó citometría de flujo. En resumen, se lavaron células A431 (depósito n.º KCLB 80005), una línea celular de carcinoma epidermoide que sobreexpresa EGFR, con BSA-PBS al 1%. Se incubaron las células lavadas (1×10^6 células) con 10 µg de los anticuerpos de la invención durante 2 horas a 4°C y se lavaron dos veces con BSA-PBS al 1%. Se usó una muestra simulada (sin anticuerpo) y hTT-2 (anticuerpo monoclonal anti-tétano; 10 µg; Green cross incorporation; patente coreana n.º 0624011) como controles negativos, y M96 (anticuerpo de ratón anti-EGFR; 10 µg) como control positivo. Se añadió conjugado de anticuerpo de cabra anti-ratón (específico de Fab) marcado con FITC a la disolución de células con anticuerpo y se incubó durante 40 minutos en hielo. Se lavaron las células dos veces con BSA-PBS al 1% y se suspendieron en 1 ml de BSA-PBS al 1% para analizarse usando citometría de flujo (FACS Calibur; BD Bioscience). Los resultados se muestran en la figura 10. Estos resultados indican que los anticuerpos de la invención ER2 y ER79 se unen a EGFR en las células A431, mientras que hTT2 (anticuerpo monoclonal anti-tétano) no se une.

Ejemplo 11: Efecto de los anticuerpos de la invención sobre la fosforilación de EGFR

45 Se sometieron a prueba los anticuerpos de la invención, ER2 y ER79, para determinar su capacidad para inhibir la fosforilación de EGFR. En resumen, se incubaron células MDA-MB-231 (depósito n.º KCLB 30026), una línea celular de cáncer de mama, en placas de 24 pocillos (NUNC) a una concentración de células de 1×10^5 . Dos días después, se añadieron a cada pocillo los anticuerpos de la invención, en cantidades de 5, 25, 50 y 100 µg, respectivamente, y entonces se añadieron a cada pocillo 50 ng de EGF y se incubaron durante 30 minutos. Para comparación, se emplearon el anticuerpo M96 (Green cross incorporation, Corea; véase la patente coreana n.º 0680141), el anticuerpo C225 (nombre comercial: Erbitux; ImClone, EE.UU.) y el anticuerpo ER 414, en lugar de los anticuerpos de la invención. Se prepararon extractos celulares usando 0,5 ml de tampón de lisis (Tris 10 mM, NaCl 150 mM,

EDTA 5 mM, Triton X-100 al 1%, ortovanadato de sodio 1 mM) por pocillo. Se sometieron los extractos celulares a electroforesis en SDS-PAGE y las proteínas separadas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se bloqueó la membrana durante 30 minutos usando disolución de BSA al 5%, y se realizó inmunotransferencia de tipo Western durante la noche a 4°C usando el conjugado de peroxidasa específico anti-fosfotirosina (Zymed, EE.UU.) que reacciona específicamente con EGFR fosforilado. Se lavó la membrana de inmunotransferencia de tipo Western con PBST que contenía Tween al 0,05% y se reveló usando un sustrato de 4-cloro-1-naftol al 0,018% (v/v) y peróxido de hidrógeno al 0,045% en PBS y metanol. Los resultados se muestran en la figura 11. Estos resultados indican que las cantidades de anticuerpos afectan a la fosforilación de EGFR y ER2 y ER79 tienen capacidades inhibitoras similares de la fosforilación de EGFR en comparación con el grupo de control positivo tratado con Erbitux.

Ejemplo 12: Identificación de los sitios de unión de los anticuerpos a EGFR

Con el fin de comprobar si los anticuerpos de la invención, ER2 y ER79, tienen los mismos sitios de unión a EGFR que un anticuerpo quimérico C225 (Erbitux, ImClone, EE.UU.), se usó una tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR; Biacore 2000). Se inmovilizó el antígeno de EGFR antígeno sobre un chip de superficie de dextrano carboximetilado (CM5 chip, Pharmacia) en unidades de respuesta de aproximadamente 1.000. Entonces, se inyectó el anticuerpo C225 sobre el chip, y se inyectaron inmediatamente ER2 y ER79 sin disociación entre los antígenos y los anticuerpos, respectivamente, seguido por medición de la reacción de unión a 25°C. Los resultados se muestran en la figura 12. Se muestra que los anticuerpos humanos de la invención tienen diferentes sitios de unión con el anticuerpo C225.

Lista de secuencias

<110> GREEN CROSS Corporation

<120> Anticuerpos que se unen específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico

<130> PCA908052GCC

<150> KR10-2009-0092401

<151> 29-09-2009

<160> 44

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR 1 de región variable de cadena pesada de anticuerpo humano

<400> 1

Asp Tyr Asp Met Ser
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR 2 de región variable de cadena pesada de anticuerpo humano

<400> 2

Gly Ile Leu Gly Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR 3 de región variable de cadena pesada de anticuerpo humano

5 <400> 3
 His Gly Ser Pro Gly Tyr Thr Leu Tyr Ala
 1 5 10

<210> 4
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> CDR 1 de región variable de cadena ligera de anticuerpo humano

<400> 4
 Arg Ser Asn Gln Asp Leu Thr His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

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

<220>

25 <223> CDR 2 de región variable de cadena ligera de anticuerpo humano

<400> 5
 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> CDR 3 de región variable de cadena ligera de anticuerpo humano

<400> 6
 Met Gln Gly Thr His Trp Pro Trp Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Región variable de cadena pesada de anticuerpo humano

<400> 7

50

ES 2 592 883 T3

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

5 <210> 8
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Región variable de cadena ligera de anticuerpo humano

<400> 8
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Asn Gln Asp Leu Thr His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Trp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105 110

Arg

15 <210> 9
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> CDR 1 de región variable de cadena ligera de anticuerpo humano

<400> 9

ES 2 592 883 T3

Arg Ser Ser Gln Ser Val Asp Met Gly Ile Gly Asn Asn Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

5 <210> 10
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Región variable de cadena ligera de anticuerpo humano

<400> 10
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Val Asp Met Gly
 20 25 30
 Ile Gly Asn Asn Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Trp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105 110

Arg

15 <210> 11
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> CDR 1 de región variable de cadena pesada de anticuerpo humano

<400> 11
 gactacgaca tgagc

15

25 <210> 12
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> CDR 2 de región variable de cadena pesada de anticuerpo humano

<400> 12
 gggatcccttg gtggtagtga gcgttcgtac tatagggact ccgtgaaggg c

51

35 <210> 13
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

ES 2 592 883 T3

	<220>		
	<223> CDR 3 de región variable de cadena pesada de anticuerpo humano		
	<400> 13		
5	cacggcagcc cgggatacac gttgtatgcg tgggactac		39
	<210> 14		
	<211> 366		
	<212> ADN		
10	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Región variable de cadena pesada de anticuerpo humano		
15	<400> 14		
	gaggatgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtacagc ctggagggtc cctgagactc	60	
	tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactacgaca tgagctggat cggccaggct	120	
	ccagggaaagg ggctggagtg ggtctcaggg atccttggtg gtagtgagcg ttcgtactat	180	
	agggactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaggaa aaccctgtat	240	
	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagacacggc	300	
	agccccgggat acacgttgta tgcgtgggac tactggggcc aagggaccac ggtcaccgtc	360	
	tcctca	366	
	<210> 15		
	<211> 48		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> CDR 1 de región variable de cadena ligera de anticuerpo humano		
25	<400> 15		
	aggctctaac aggacttgac ccatagtaac ggaaacacct atttgag		48
	<210> 16		
30	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> CDR 2 de región variable de cadena ligera de anticuerpo humano		
	<400> 16		
	aaggtttcta accggttctc t		21
40	<210> 17		
	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> CDR 3 de región variable de cadena ligera de anticuerpo humano		
	<400> 17		
	atgcaaggta cacactggcc gtggacg		27
50			

ES 2 592 883 T3

<210> 18
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Región variable de cadena ligera de anticuerpo humano
 <400> 18
 gatattgtga tgaccagac tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
 atctcatgca ggtctaatca ggacttgacc catagtaacg gaaacaccta ttggagtgg 120
 tacctgcaga agccagggca gtctccaaga ctctaatatt ataaggtttc taaccggttc 180
 tctgtctcca aagacaaccg gtgtggcagt ggggcaggta caaccgtcac actgagaatc 240
 agcaggggtgg aagctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaaggtag acactggccg 300
 tggacgttcg gccaaaggac caaggtggat atcaaact 339

<210> 19
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> CDR 1 de región variable de cadena ligera de anticuerpo humano
 20
 <400> 19
 aggtctagtc agagcgtcga catggggatc gaaacaact attggag 48

<210> 20
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Región variable de cadena ligera de anticuerpo humano
 30
 <400> 20
 gataatgtga tgaccagac tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
 atctcatgca ggtctagtc gagcgtcgc atggggatcg gaaacaacta ttggagtgg 120
 tacctgcaga agccagggca gtctccaaga ctctaatatt ataaggtttc taaccggttc 180
 tctgggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggta cagatttcac actgagaatc 240
 agcaggggtgg aagctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaaggtag acactggccg 300
 tggacgttcg gccaaaggac caaggtggat atcaaact 339

<210> 21
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> cebador directo de scFv
 40
 <400> 21

	gttgttcctt tctatgcggc ccagccggcc atggcc	36
5	<210> 22 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> cebador inverso de scFv	
	<400> 22 gagtcattct cgacttgcgg ccgcacgttt	30
15	<210> 23 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> cebador inverso de scFv	
	<400> 23 gagtcattct cgacttgcgg ccgcacc	27
25	<210> 24 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador directo de VH1	
	<400> 24 cagccggcca tggcccaggt gcagctggtg cagtctggg	39
35	<210> 25 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> cebador directo de VH3	
	<400> 25 cagccggcca tggccsaggt gcagctggtg gagtctggg	39
45	<210> 26 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador directo de VH4	
	<400> 26 cagccggcca tggcccaggt gcagctgcag gagtctggg	39
55	<210> 27 <211> 45 <212> ADN	
60		

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso de VH	
5	<400> 27	
	cgatccgcca cctccggagc cacctccgcc tgaaccgcct ccacc	45
	<210> 28	
10	<211> 48	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> cebador directo VK1/3A	
	<400> 28	
	ggtggctccg gaggtggcgg atcggacatc cagatgaccc agtctcca	48
	<210> 29	
20	<211> 48	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> cebador directo VK1/3B	
	<400> 29	
	ggtggctccg gaggtggcgg atcggaaatt gtgttgaccg agtctcca	48
	<210> 30	
30	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> cebador directo VK2	
	<400> 30	
40	ggtggctccg gaggtggcgg atcggatatt gtgatgaccc agactccact c	51
	<210> 31	
	<211> 39	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso JK_A	
	<400> 31	
50	tcgacttgcg gccgcacgtt tgalwtccac yttggctccc	39
	<210> 32	
55	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> cebador inverso JK_B	
	<400> 32	

	tcgacttgcg gccgcacggt tgatctccas cttgggtccc	39
	<210> 33	
	<211> 39	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso JK_C	
10	<400> 33	
	tcgacttgcg gccgcacggt taatctccag tegtgtccc	39
	<210> 34	
15	<211> 48	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> cebador directo VL_A	
	<400> 34	
	ggtagctccg gaggtggcgg atcgcagtct gysctgactc agccaccc	48
25	<210> 35	
	<211> 48	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> cebador directo VL_B	
	<400> 35	
	ggtagctccg gaggtggcgg atcgtcctat gagctgacwc agccaccc	48
35	<210> 36	
	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> cebador inverso JL_A	
	<400> 36	
45	ttctcgactt gccgccgcac ctaggacggt sascttggtc cc	42
	<210> 37	
	<211> 42	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso JL_B	
55	<400> 37	
	ttctcgactt gccgccgcac cgaggacggt cagctgggtg cc	42
	<210> 38	

ES 2 592 883 T3

	<211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> cebador de secuenciación P033	
	<400> 38 caacgtgaaa aaattattat tcgc	24
10	<210> 39 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador directo de VH	
	<400> 39 ggagacccaa gcttgggtacc gagctcggat ccactagtaa cggccgccag tgtgctggaa	60
20		60
	<210> 40 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> cebador inverso de VH	
30	<400> 40 gaagaccgat gggcccttgg tggaggctga ggagacggtg ac	42
	<210> 41 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador directo de VL	
40	<400> 41 tagggagacc cgctagcgga gcaagatgga ttcacaggcc caggt	45
45	<210> 42 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador inverso de VL	
	<400> 42 tatagaatag ggccccccct cgaggtcgac ctaacactct ccct	45
55	<210> 43 <211> 330 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Región constante de cadena pesada de anticuerpo humano	

ES 2 592 883 T3

<400> 43
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

- 5 <210> 44
- <211> 106
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

ES 2 592 883 T3

<220>

<223> Región constante de cadena ligera de anticuerpo humano

<400> 44

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

5

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo que se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que comprende:
 - a) una región variable de cadena pesada que comprende una región determinante de complementariedad (CDR) 1, CDR 2 y CDR 3 que tiene las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente;
 - b) una región variable de cadena ligera que comprende CDR 1, CDR 2 y CDR 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente
 - c) una región constante de cadena pesada; y
 - d) una región constante de cadena ligera.
2. Anticuerpo según la reivindicación 1, que comprende:
 - a) una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;
 - b) una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;
 - c) una región constante de cadena pesada; y
 - d) una región constante de cadena ligera.
3. ADN que codifica para una región variable de cadena pesada de anticuerpo que comprende CDR 1, CDR 2 y CDR 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente; y un ADN que codifica para una región variable de cadena ligera de anticuerpo que comprende CDR 1, CDR 2 y CDR 3 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente; en el que el anticuerpo se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).
4. ADN según la reivindicación 3, que comprende el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 11 que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 12 que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 13 que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y que comprende el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 15 que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 16 que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 17 que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.
5. ADN según la reivindicación 3, que codifica para una región variable de cadena pesada de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; y que codifica para una región variable de cadena ligera de anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.
6. ADN según la reivindicación 5, que comprende el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 14 que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; y que comprende el polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 18 que codifica para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.
7. Vector de expresión para expresar la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo que se une específicamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que comprende el ADN según la reivindicación 3.
8. Vector de expresión según la reivindicación 7, que es ER2-Heavy-pRC13 cuyo mapa se muestra en la figura 5; y que es ER2-Light-pKC12 cuyo mapa se muestra en la figura 6.
9. Línea celular animal transformada con el vector de expresión según la reivindicación 7.
10. Composición para tratar un cáncer, que comprende el anticuerpo según la reivindicación 1.

FIG. 1

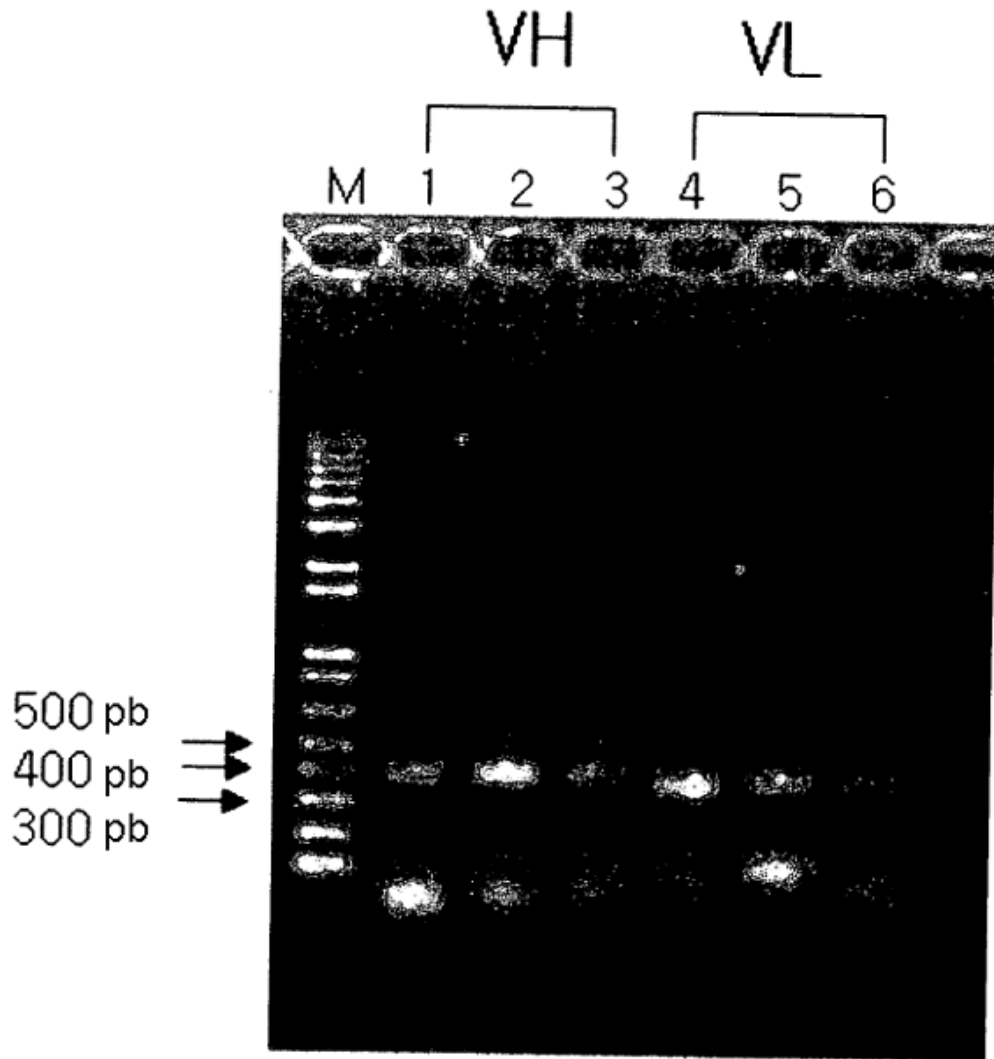


FIG. 2

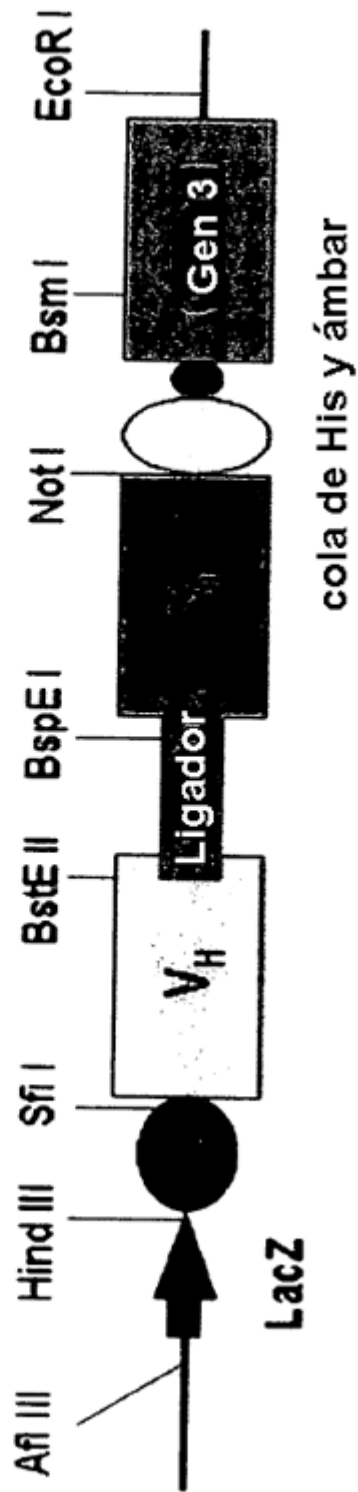


FIG. 3

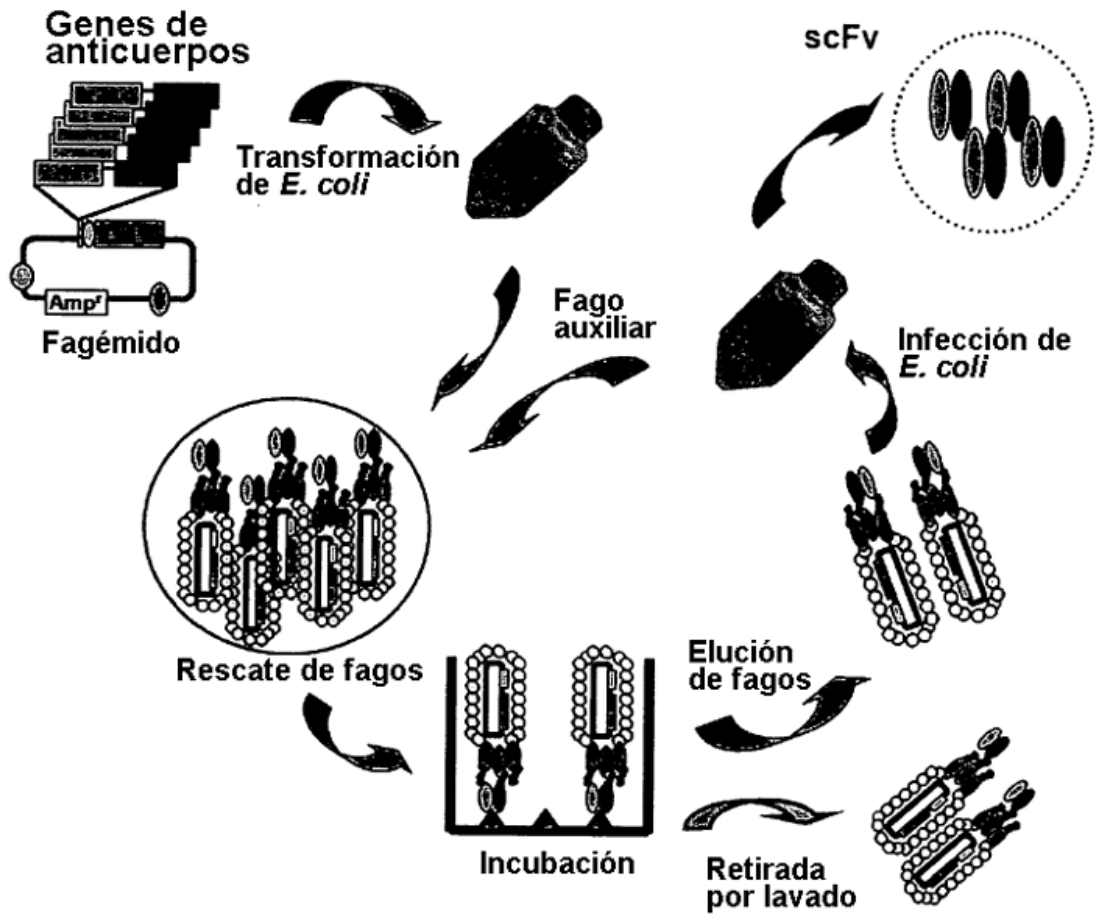


FIG. 4

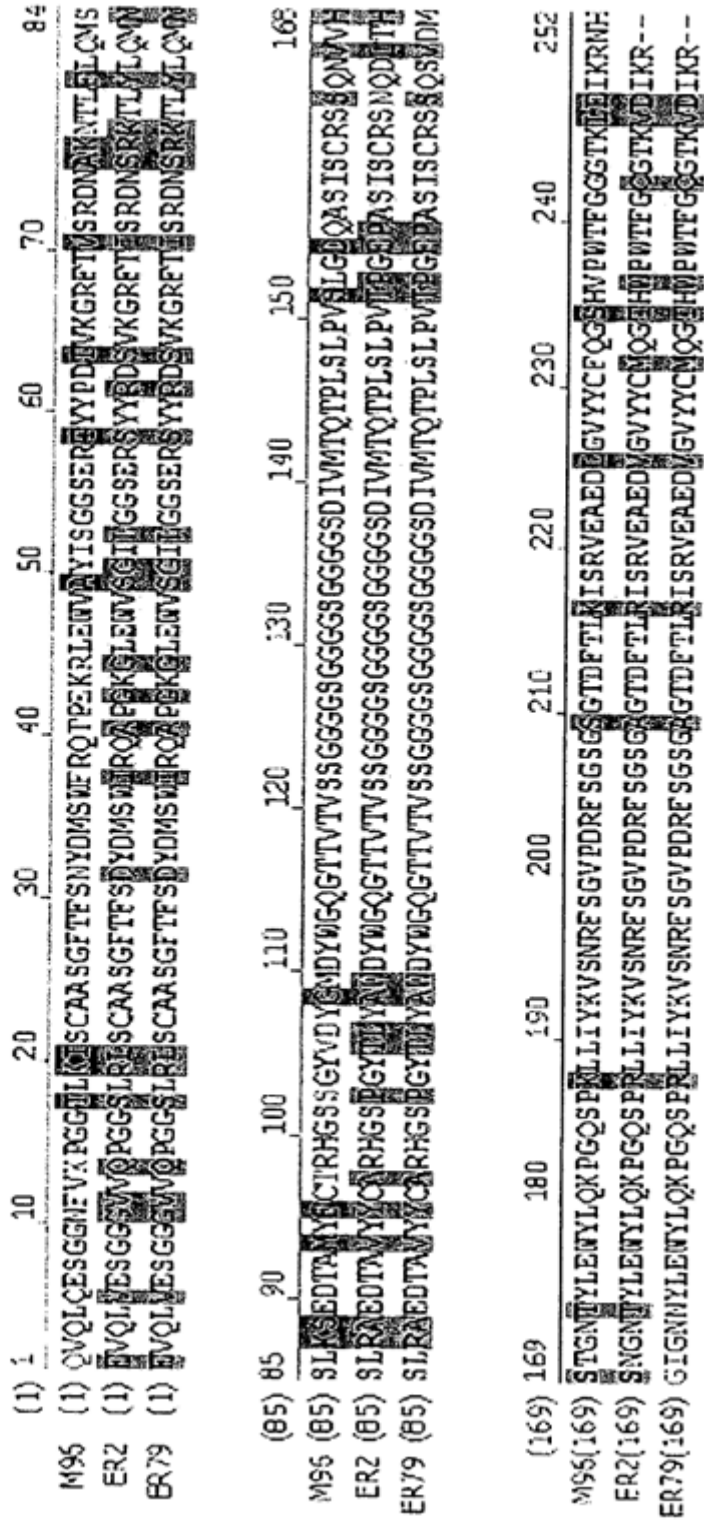


FIG. 5

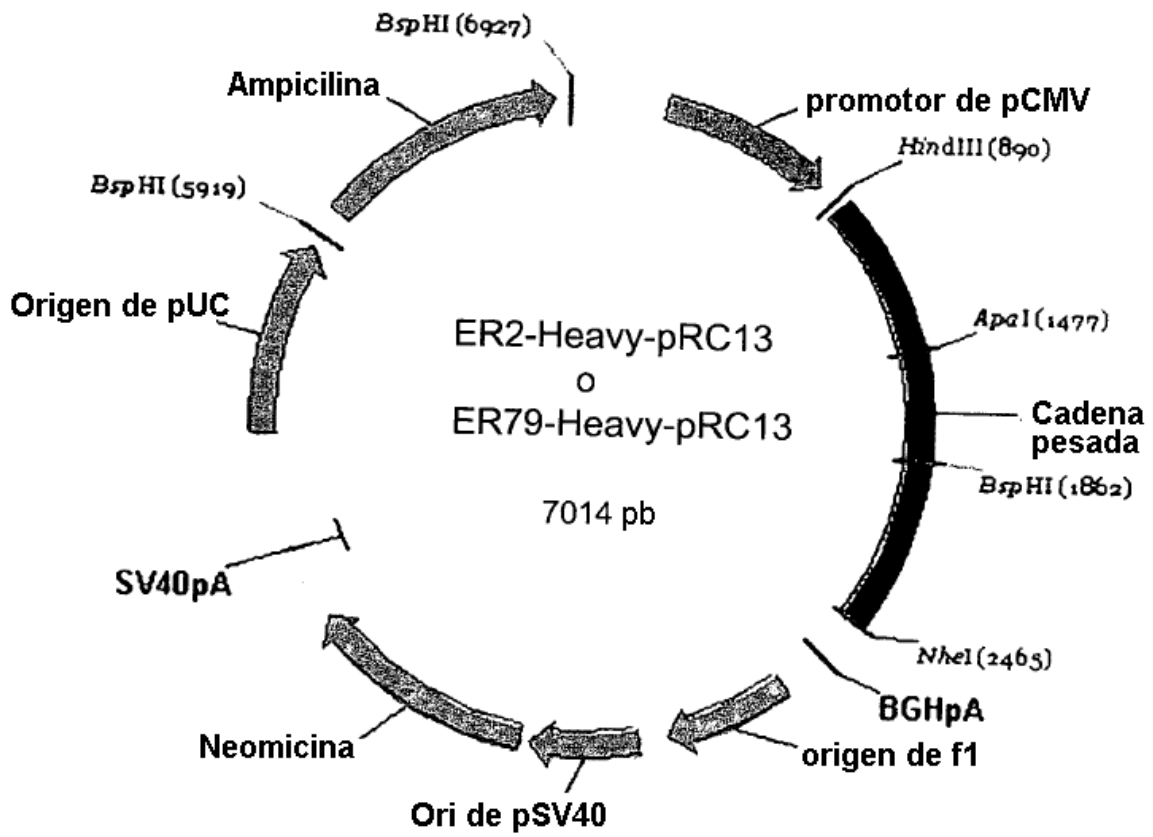


FIG. 6

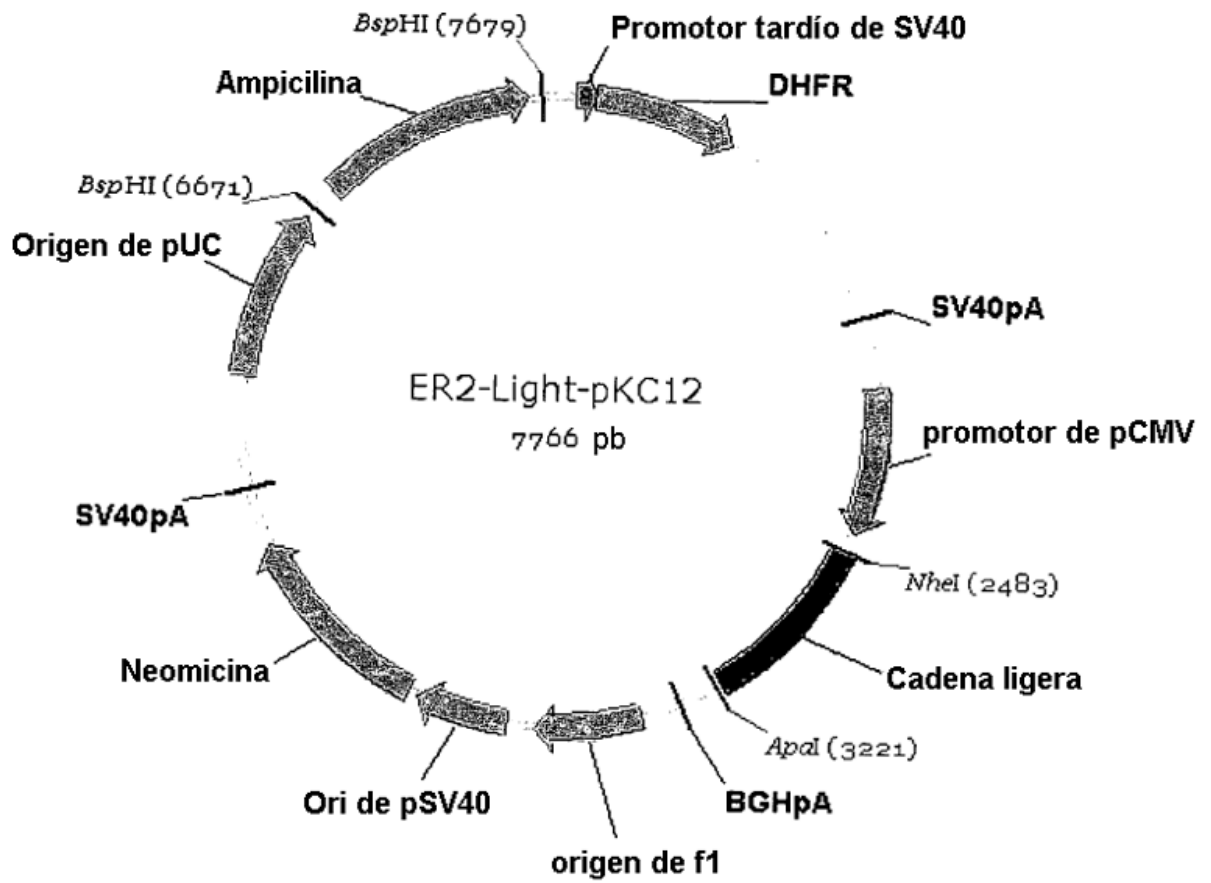


FIG. 7

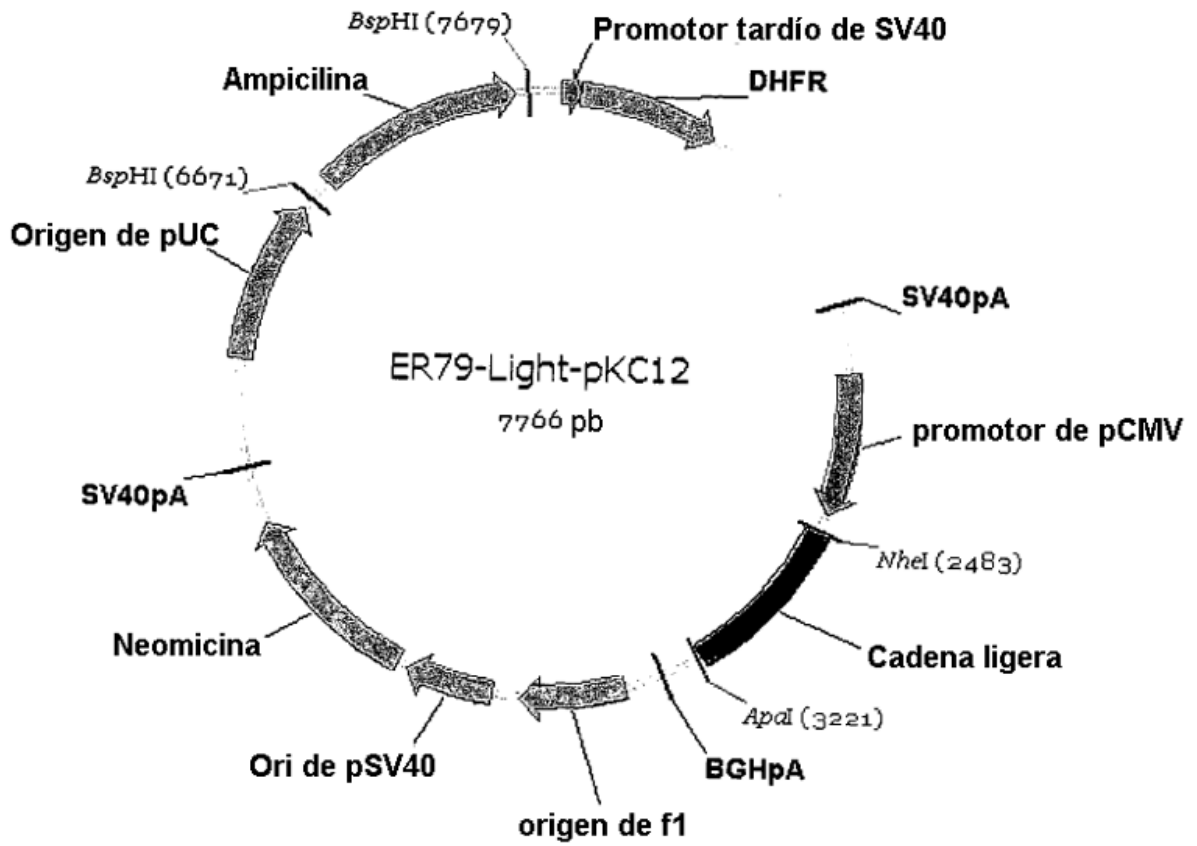


FIG. 8

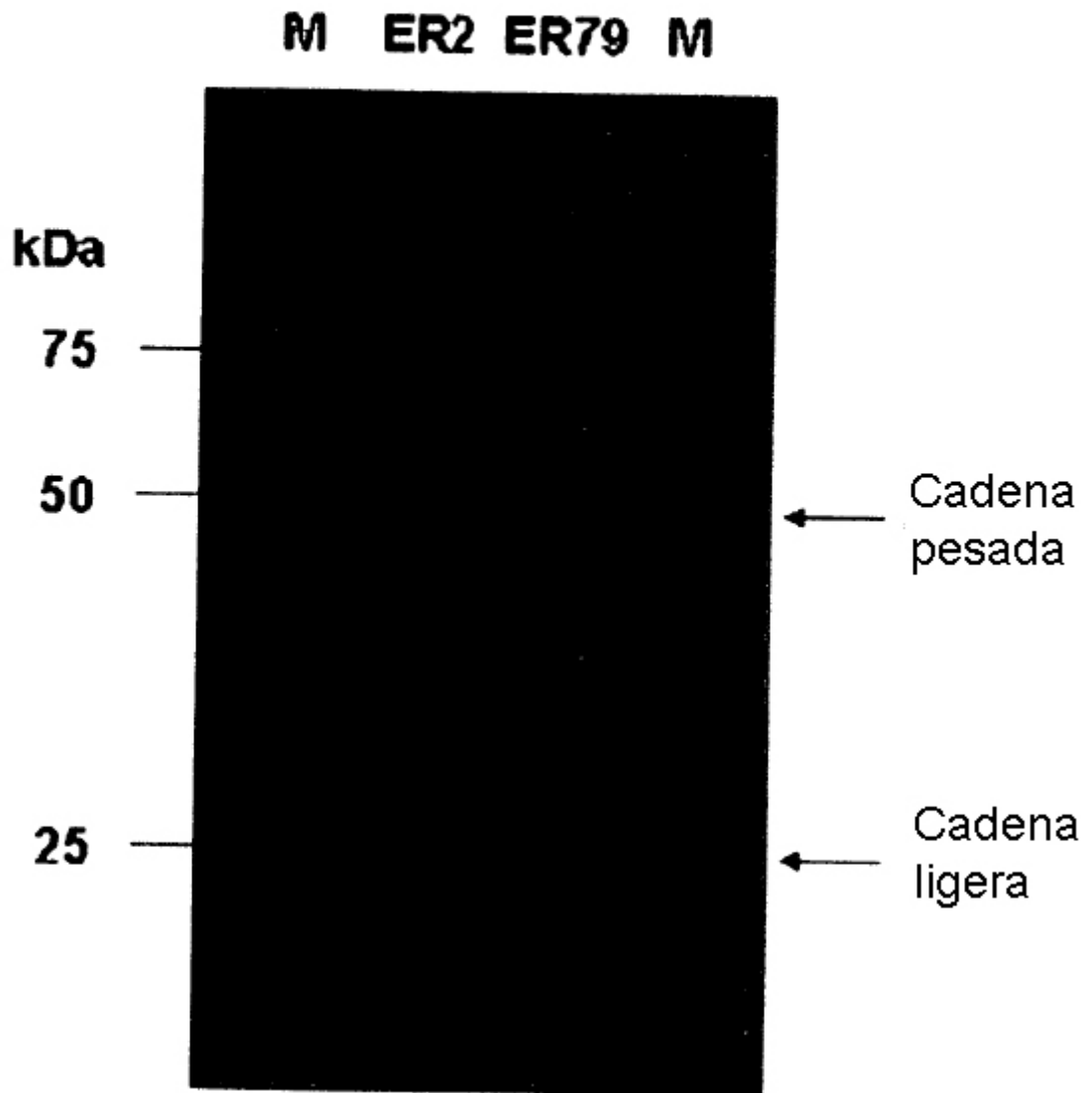


FIG. 9A

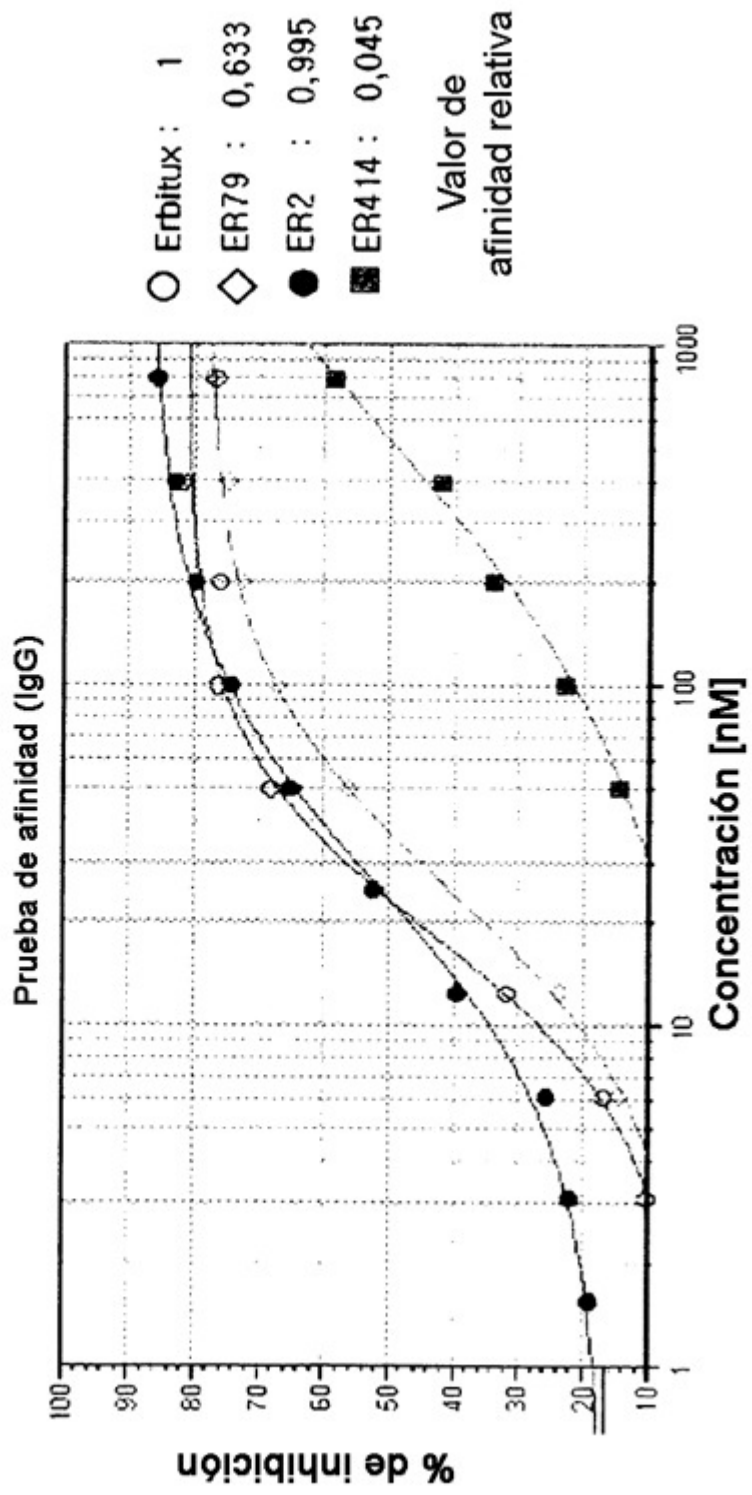


FIG. 9B

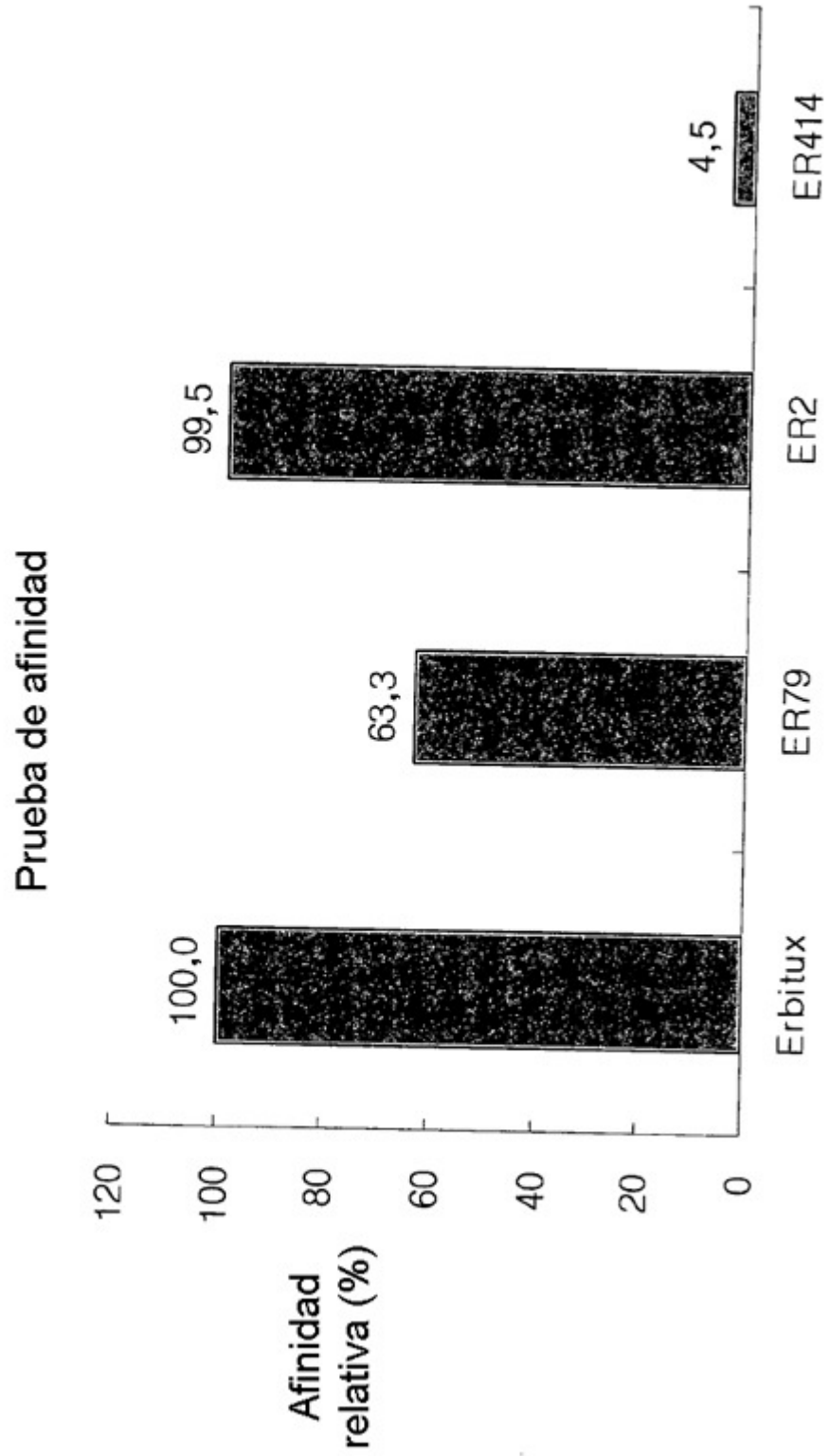


FIG. 10

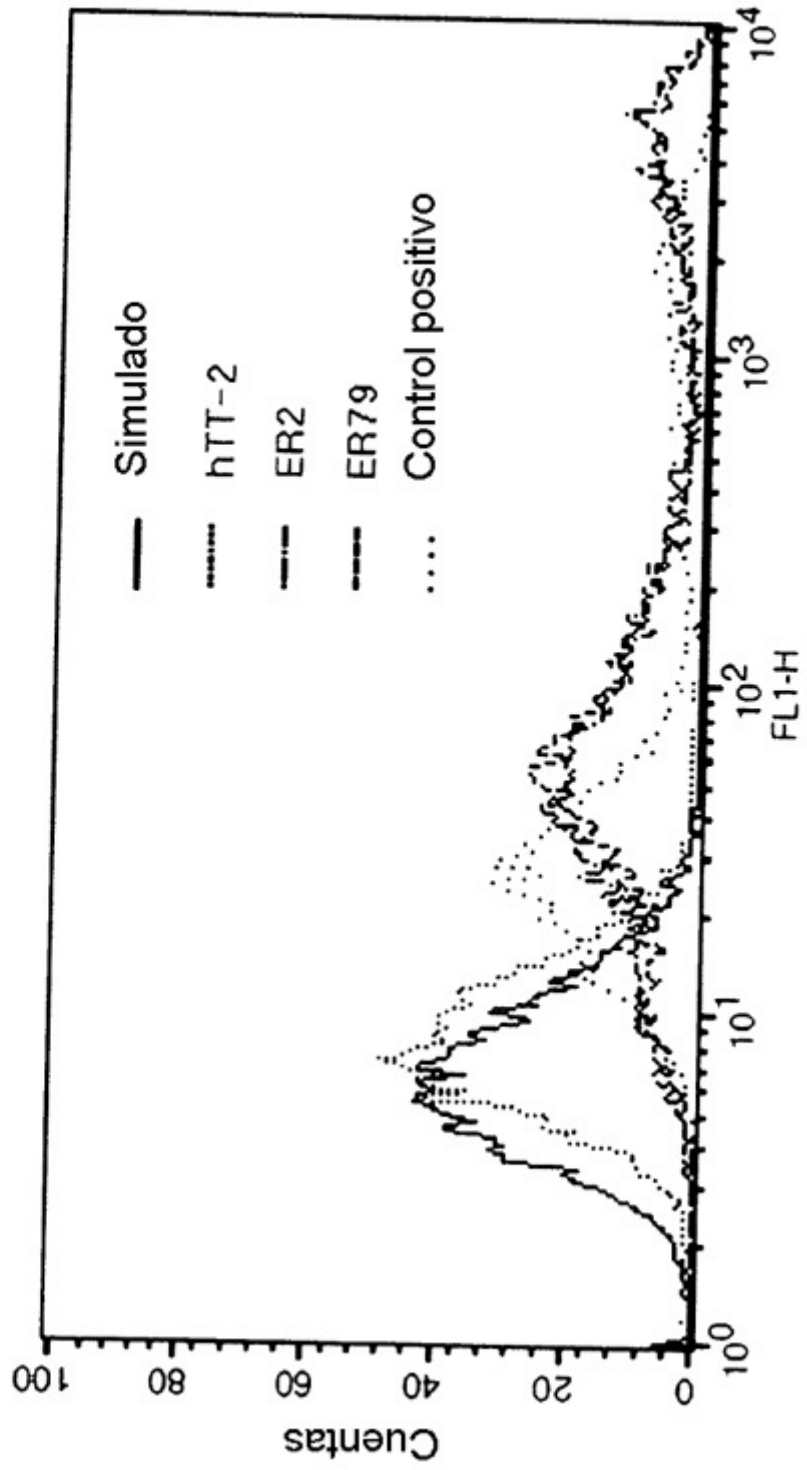
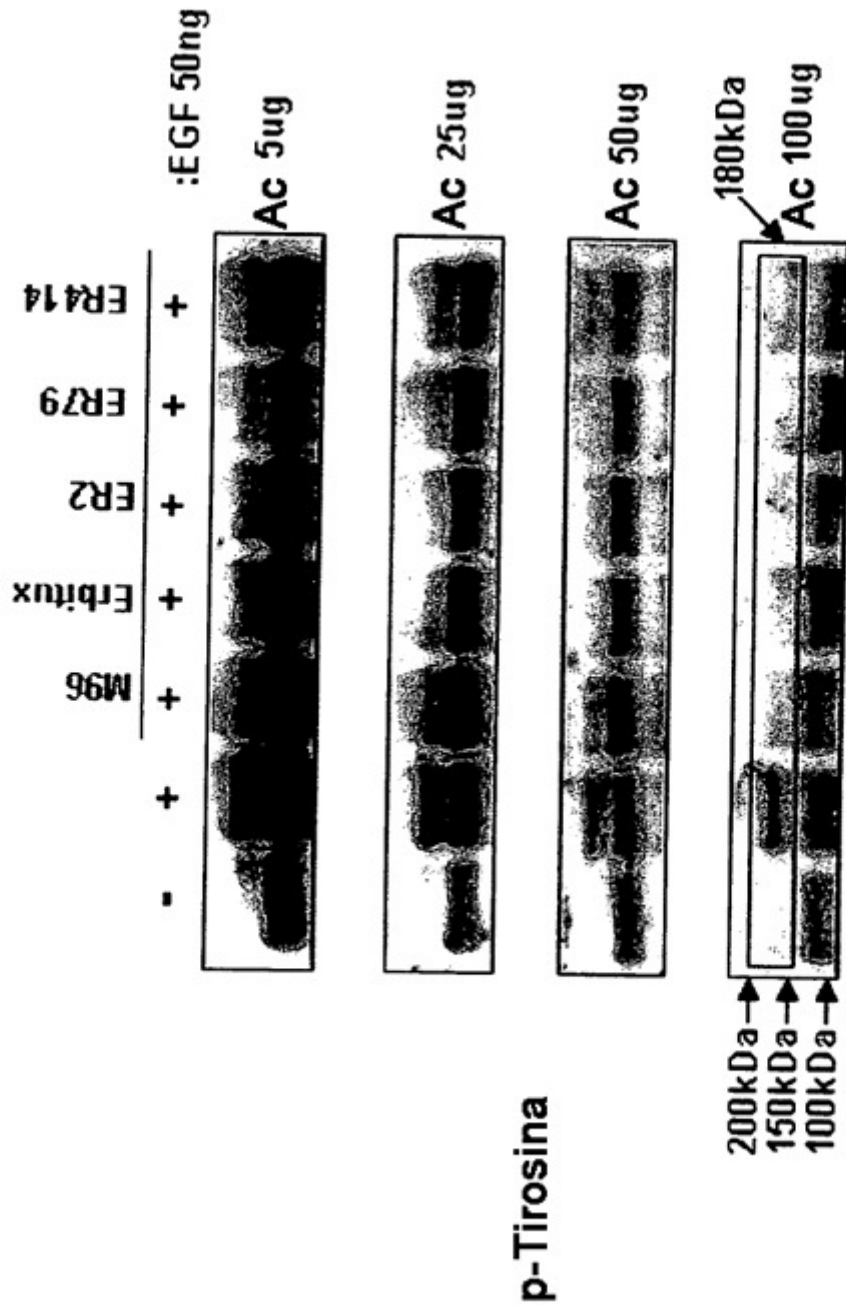


FIG. 11



Células: MDA-MB-231 (células de cáncer de mama),
1*10⁵ células/pocillo/24 pocillos

FIG. 12A

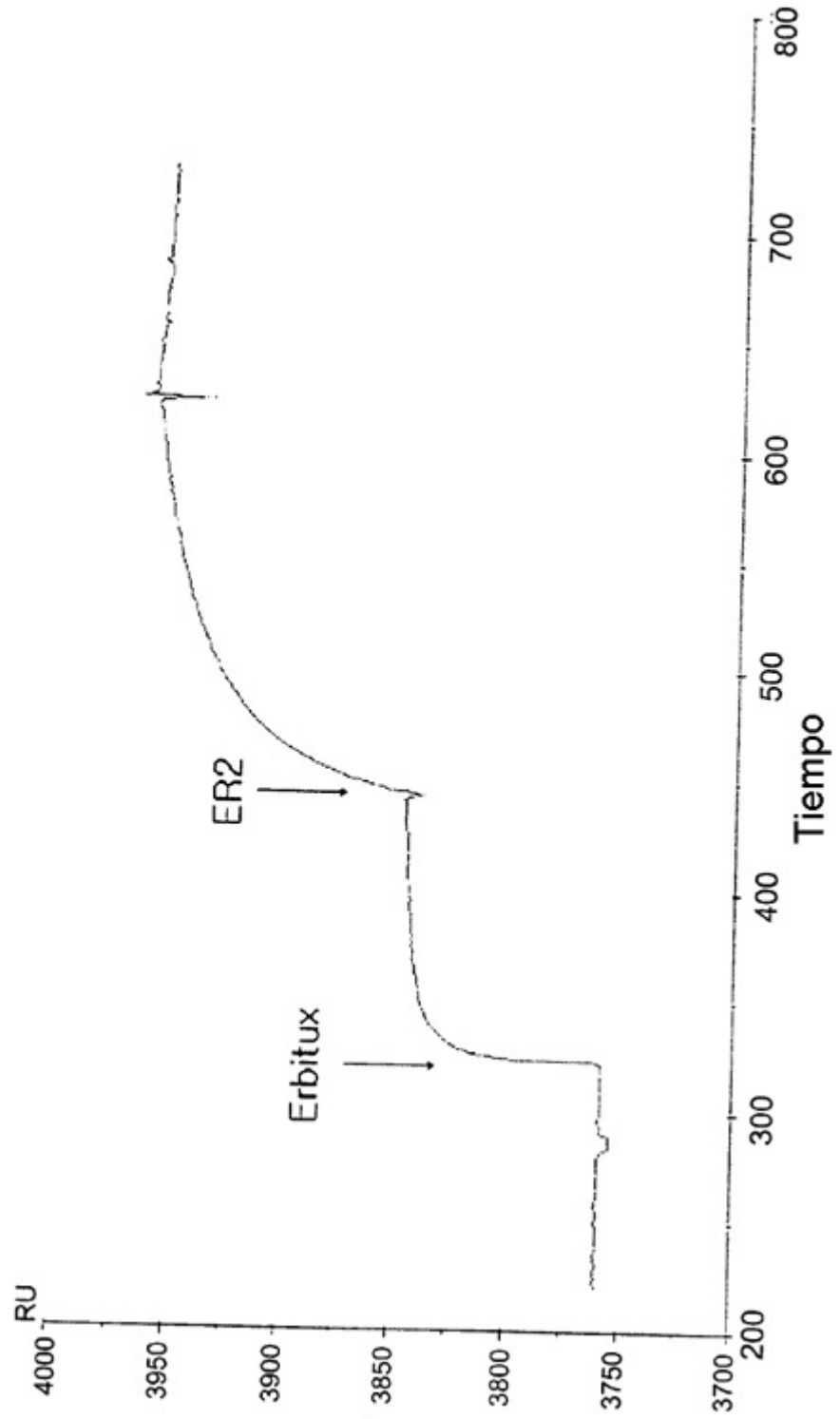


FIG. 12B

